

Université de Sherbrooke

Activité in vivo d'un plasmide recombinant contenant  
un tandem de deux génomes du virus du polyome

par

© Louise Bouchard

Département de Microbiologie

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine  
en vue de l'obtention du grade de  
maître ès sciences (M. Sc.)

Juillet 1985

## TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES.....	ii
LISTE DES FIGURES.....	v
LISTE DES TABLEAUX.....	vi
LISTE DES ABREVIATIONS.....	vii
RESUME.....	viii
INTRODUCTION.....	1
MATERIEL ET METHODES.....	11
I. Virus.....	11
II. Plasmides recombinants.....	11
III. Production des plasmides multimériques.....	15
1. Souches bactériennes.....	15
2. Transformation de la souche bactérienne <u>E. coli</u> X-1776.....	15
3. Transformation de la souche bactérienne <u>E. coli</u> HB 101.....	17
4. Extraction des plasmides.....	18
IV. Induction de tumeurs par injection de plasmides recombinants.....	19
V. Etablissement des lignées tumorales.....	20
VI. Analyse des séquences virales intégrées dans l'ADN chromosomique des cellules tumorales....	21
1. Extraction d'ADN cellulaire.....	21
2. Extraction d'ADN de petit poids moléculaire	23

3. Transfert d'ADN sur filtre de nitrocellulose.....	24
4. Hybridation du filtre à une sonde radioactive.....	25
5. Préparation d'une sonde radioactive.....	26
VII. Injection de plasmides recombinants à des souris nues.....	26
VIII. Mise en évidence des séquences virales dans les cellules de souris nues.....	27
1. Extraction de l'ADN des reins.....	27
RESULTATS.....	29
I. Construction des plasmides multimériques.....	29
1. Formes multimériques des recombinants pPA8 et pPB21.....	30
2. Formes multimériques du recombinant pPE7.....	35
II. Arrangement des séquences dimériques dans les tumeurs induites chez les rats nouveaux-nés...	35
1. Construction du recombinant pPB22.....	35
2. Tumorigénicité du recombinant pPB22.....	39
3. Séquences virales intégrées dans l'ADN cellulaire des différentes lignées tumorales.....	40
4. Détection de molécules libres dans les cellules tumorales.....	48
III. Activité du recombinant pPB22 chez les souris nues.....	49
DISCUSSION.....	50
I. Construction des plasmides multimériques.....	55

II. Arrangement des séquences dimériques dans les tumeurs induites chez les rats nouveaux-nés...	60
III. Activité du recombinant pPB22 chez les souris nues.....	62
REMERCIEMENTS.....	66
REFERENCES.....	67



## LISTE DES FIGURES

Figure 1. Carte physique du génome du virus du polyome..	2
Figure 2. Carte physique du recombinant pPA8.....	12
Figure 3. Carte physique du recombinant pPB21.....	13
Figure 4. Carte physique du recombinant pPE7.....	14
Figure 5. Caractérisation des formes multimériques de pPA8 et pPB21.....	32
Figure 6. Caractérisation de la forme trimérique de pPA8 par digestion partielle.....	34
Figure 7. Caractérisation des multimères de pPE7.....	36
Figure 8. Construction du recombinant pPB22.....	38
Figure 9. Potentiel tumorigène du recombinant pPB22.....	41
Figure 10. Analyse des séquences virales intégrées dans les lignées tumorales par l'enzyme BglII.....	43
Figure 11. Analyse des séquences virales intégrées dans les lignées tumorales par l'enzyme HindIII...	45
Figure 12. Délimitation des séquences virales présentes dans les lignées tumorales T1 et T3.....	46
Figure 13. Détection de molécules libres dans les lignées tumorales.....	50
Figure 14. Détection de génomes viraux libres dans les reins de souris nues.....	52
Figure 15. Caractérisation aux enzymes de restriction des génomes viraux présents dans les reins de souris nues.....	53

## LISTE DES TABLEAUX

- Tableau 1. Formes oligomériques obtenues après  
stabilisation dans la souche E. coli HB101.... 31
- Tableau 2. Formes oligomériques obtenues en fonction du  
poids moléculaire de l'unité monomérique..... 58

## LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	Acide déoxyribonucléique
BSA	Bovine serum albumine
°C	Degré celsius
cm	Centimètre
cpm	Coup par minute
DMSO	Diméthylsulfoxyde
EDTA	Ethylène diamine tétraacétate
Kb	Kilo paires de bases
Kd	Kilodalton
M	Molaire
ml	Millilitre
mm	Millimètre
mM	Millimolaire
ng	Nanogramme
pb	Paire de base
rpm	Révolution par minute
SDS	Sodium dodécyl sulfate
Tris	Hydroxyméthyl - aminométhane
$\mu$ Ci	Microcurie
$\mu$ g	Microgramme
$\mu$ l	Microlitre
$\mu$ M	Micromolaire

## RESUME

L'intérêt que nous portons à la relation existant entre la transformation néoplasique par le virus du polyome et le mode d'intégration du génome viral dans l'ADN cellulaire nous a amenés à construire une série de molécules multimériques à partir de plasmides recombinants encodant différentes portions du génome viral. Les plasmides multimériques ont été obtenus par l'intermédiaire du système de recombinaison de différentes souches bactériennes. L'introduction des unités monomériques dans la souche bactérienne E. coli X-1776, qui est rec+, nous a permis d'obtenir des molécules oligomériques. Ces dernières ont été stabilisées dans la souche rec A- HB101, avant d'être caractérisées. Les multimères obtenus contiennent un nombre entier de copies de l'unité de départ qui sont liées entre elles en tandem tête à queue. La fréquence d'obtention d'un multimère donné est d'autant plus faible que le nombre de copies de l'unité de départ qu'il contient est élevé. De plus, la technique utilisée ne nous a pas permis d'obtenir de molécule de plus de 20 Kb. C'est donc dire que plus un plasmide monomérique est petit, plus le nombre maximal de copies que l'on puisse en obtenir dans un multimère est élevé.

Par modification d'une des molécules multimériques obtenues, nous avons produit un recombinant contenant un tandem de deux copies complètes du génome viral lié au

plasmide pBR322. Le potentiel tumorigène de cette molécule (pPB22) a été évalué chez les rats nouveaux-nés et s'est avéré comparable à celui de recombinants ne contenant qu'une copie du génome viral ou que la portion proximale de sa région précocée. Comme dans le cas de tumeurs induites avec une seule copie du génome viral, les lignées tumorales induites par pPB22 ne peuvent produire l'antigène grand T. Ceci rend encore plus plausible, l'hypothèse qui avait déjà été émise et selon laquelle il y aurait sélection in vivo contre les cellules produisant cette protéine virale.

Suite à l'injection de pPB22 à des souris nues, la souris étant l'hôte naturel de polyome, nous avons pu détecter la production de génomes viraux libres dans les reins des animaux. Cette production s'est même manifestée chez un des animaux injectés, par l'apparition des symptômes liés à une infection par le virus du polyome. Les génomes viraux seraient apparus chez les animaux suite à un événement de recombinaison intramoléculaire impliquant le recombinant pPB22. L'environnement permissif fourni par les souris aurait assuré la réplication des génomes viraux ainsi libérés.



## INTRODUCTION

Le virus du polyome a été isolé pour la première fois en 1953 comme contaminant d'une préparation de virus responsable de la leucémie chez la souris (Gross, 1953a,b). Ce petit papovavirus est composé d'une capside protéique de forme icosahédrique ayant 45 nm de diamètre. Cette capside protège une molécule d'ADN double brin circulaire comptant 5292 paires de bases (Soeda et al., 1980). Généralement, le virus du polyome cause une infection silencieuse chez son hôte naturel, la souris, alors qu'il provoque le développement de tumeurs chez d'autres rongeurs comme le rat et le hamster. En culture, le virus a un effet cytopathogène sur les cellules de souris et transforme les cellules de rat (Tooze, 1981).

Lorsqu'on représente le génome viral sur une carte circulaire (figure 1), on le subdivise en 100 unités, à partir de son unique site Eco R1 en progressant dans le sens des aiguilles d'une montre (Griffin et al., 1974). Sur cette carte, les nucléotides sont numérotés dans le même sens à partir de l'origine de répllication qui se situe à 71 unités environ (Crawford et al., 1974; Fried et al., 1974). L'origine de répllication est située dans la partie non codante du génome qui s'étend entre les nucléotides 5003 et 172. Cette même région non-codante comprend également les signaux pour l'initiation de la transcription. De part et d'autre et sur les brins opposés s'étendent deux régions

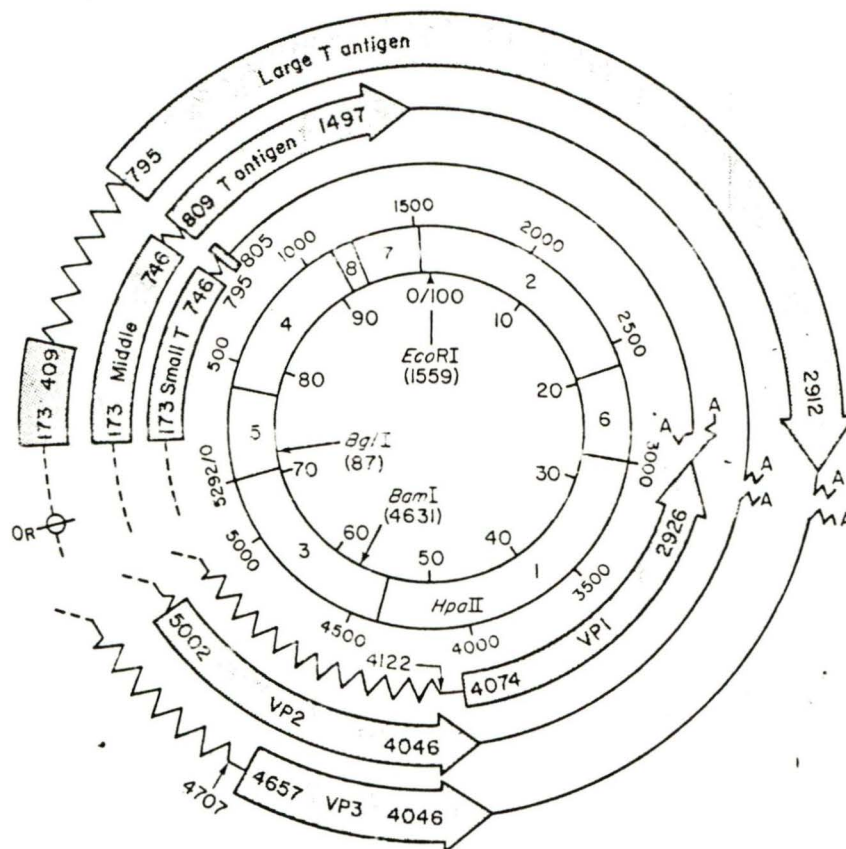


Figure 1. Carte physique du génome du virus du polyome. Le génome représenté sous la forme circulaire est divisé en 100 unités à partir de son unique site *EcoRI*, en progressant dans le sens des aiguilles d'une montre. Les nucléotides sont numérotés dans le même sens à partir de l'origine de réplication. Les séquences de la région précoce encodant les antigènes petit T, T moyen et grand T sont représentés ainsi que les différentes portions de la région tardive encodant les protéines de la capsid VP1, VP2 et VP3 (Tooze, 1981).



codantes, chacune occupant environ la moitié du génome (Soeda et al., 1980). La première, la région précoce va de 74.0 à 25.5 unités sur la carte génomique et est exprimée au tout début du cycle lytique avant la réplication du génome viral. Colinéairement, sa capacité codante est d'environ 100 000 daltons. Par trois événements d'épissage différents d'un même messenger, elle produit trois protéines différentes, les antigènes petit T, moyen T et grand T ayant respectivement des poids moléculaires de 22 000, 55 000 et 90 000 daltons (Schaffhausen et al., 1978; Ito et al., 1977a). Ces trois protéines ont une partie N-terminale commune. Leurs parties centrales et C-terminales diffèrent, les cadres de lecture ayant changé suite aux trois événements d'épissage. La région tardive s'étend de 65.0 à 25.5 unités sur la carte génomique et est exprimée à la fin du cycle lytique, suite à la réplication du génome viral. Elle encode trois peptides VP1, VP2 et VP3 de 47 000, 35 000 et 23 000 daltons respectivement qui sont les composants de la capside virale (Fine et al., 1968; Roblin et al., 1971; Frearson and Crawford, 1972; Gibson, 1974; Herrick et al., 1975).

Lorsqu'on infecte des cellules semi-permissives ou non permissives (cellules de rat ou de hamster) avec le virus du polyome, ou encore qu'on y introduit l'ADN viral par transfection, la région précoce du génome viral est transcrite et la synthèse d'ADN cellulaire est stimulée. On observe alors l'expression transitoire des propriétés

caractéristiques des cellules transformées. Mais, rapidement, la plupart des cellules cessent de transcrire l'ADN viral, le perdent et retournent à un état normal. C'est le phénomène de la transformation abortive. Cependant une faible proportion de la population cellulaire stabilise le génome viral en l'intégrant dans l'ADN cellulaire de façon à poursuivre la transcription des séquences virales et l'expression des protéines précoces. Ces cellules acquièrent ainsi de nouvelles propriétés de façon permanente. Un changement au niveau de leur morphologie, la perte d'inhibition de contact, la capacité de croître sans support solide ainsi que le pouvoir d'induire le développement de tumeurs chez des animaux syngéniques sont quelques unes des nouvelles propriétés acquises par les cellules transformées. La transformation de cellules en culture résulte donc de l'intégration et du maintien du génome viral dans l'ADN cellulaire ainsi que de l'expression de certains gènes viraux. La région précoce à elle seule encode toutes les fonctions virales nécessaires à ce processus (Israel et al., 1979; Bastin et al., 1980; Hassell et al., 1980; Novak et al., 1980).

Les antigènes viraux produits dans les cellules transformées par le virus du polyome varient en nombre et en quantité d'une lignée cellulaire à l'autre (Ito and Spurr, 1979), mais se retrouvent toujours parmi les protéines

précoces petit T, T moyen et grand T. L'antigène petit T, auquel aucune fonction n'a encore été associée se retrouve dans le cytoplasme des cellules (Türler and Salomon, 1977). L'antigène T moyen se localise à la membrane cytoplasmique (Ito et al., 1977b). Cette protéine est associée à une activité kinasique sur les résidus tyrosine dont elle est le substrat (Eckhart et al., 1979; Schaffhausen and Benjamin, 1979). Quant à l'antigène grand T, on le retrouve dans le noyau des cellules. Cette phosphoprotéine est impliquée dans l'initiation de la réplication du génome viral. Il agit également en tant que répresseur de la transcription des gènes viraux précoces (Cogen, 1978).

De ces trois protéines, seuls les antigènes petit T et T moyen sont toujours présents dans les cellules transformées ce qui permet de les associer à l'expression du phénotype transformé (Hutchinson et al., 1978; Israel et al., 1979; 1980a; Hassell et al., 1980; Lania et al., 1980; Novak et al., 1980; Della Valle et al., 1981). De plus, l'étude du potentiel transformant de différents mutants du virus a permis de mettre en évidence un rôle crucial pour l'antigène T moyen dans le processus de la transformation (Griffin and Maddock, 1979; Magnusson and Berg, 1979; Griffin et al., 1980; Ito et al., 1980). L'antigène grand T, quant à lui, serait produit au départ par la majorité des lignées transformées par le virus. Toutefois, après un nombre élevé



de passages, plusieurs lignées perdent la capacité de synthétiser la protéine ou encore produisent une protéine tronquée. Ceci suggère que l'antigène grand T est impliqué dans l'établissement de la transformation probablement en favorisant l'intégration du génome viral dans l'ADN de l'hôte. Cependant, la présence d'un grand T fonctionnel dans les cellules transformées rendrait également l'ADN viral instable. Ceci explique pourquoi, en plus d'être présent dans les cellules transformées, sous forme intégré dans l'ADN cellulaire, le génome viral peut également être retrouvé sous forme libre, non associé au génome de l'hôte. Il semble que ces génomes viraux libres sont produits par une faible proportion de la population cellulaire suite à l'induction spontanée de la réplication de l'ADN viral (Prasad et al., 1976; Magnusson et al., 1977; Zouzias et al., 1977; Basilico et al., 1979; Birg et al., 1979; Lania et al., 1979; Colantuoni et al., 1980). De plus, le passage extensif des cellules en culture réduit ou même élimine les génomes viraux libres. Ce phénomène peut s'expliquer soit par le fait qu'il y a sélection contre les cellules produisant ces génomes ou encore par le fait que les plasmides viraux à réplication autonome sont éventuellement perdus (Birg et al., 1979). Quant aux séquences virales intégrées dans l'ADN cellulaire, elles sont d'abord présentes à plus d'un site et contiennent généralement des tandems tête à queue du génome viral complet allant de moins de deux copies à plus de cinq par insert

(Birg et al., 1979). Après un nombre élevé de passages en culture, on observe fréquemment une diminution du nombre d'insertions du génome viral dans l'ADN cellulaire (Basilico et al., 1979, 1980). Tous ces résultats suggèrent donc que les cellules transformées par le virus du polyome contiendraient initialement un certain nombre d'insertions du génome viral dans l'ADN cellulaire. Ces séquences seraient réarrangées au cours des passages jusqu'à ce qu'elles atteignent un état de stabilité. C'est cette stabilisation qui impliquerait dans certains cas l'apparition de cellules ne produisant plus l'antigène grand T ou produisant une protéine tronquée.

Lorsqu'on transplante des cellules transformées par le virus du polyome à des animaux syngéniques, elles peuvent induire le développement de tumeurs. On peut également obtenir des tumeurs en injectant des virions ou encore le génome viral à des animaux nouveaux-nés. Dans ce dernier cas les tumeurs ainsi induites produisent les antigènes petit T et T moyen mais ne produisent jamais un antigène grand T fonctionnel (Israel et al., 1980a,b; Lania et al., 1981). Ceci résulte souvent de l'interruption des séquences virales encodant l'extrémité carboxy-terminale de grand T, d'où l'hypothèse d'une sélection in vivo contre les cellules produisant l'antigène (Israel et al., 1980a,b). Dans le cas de tumeurs induites par transplantation de cellules transformées, si la lignée utilisée ne contient qu'une

insertion virale, et ne produit ni l'antigène grand T, ni de génomes viraux libres, les cellules tumorales présentent la même organisation des séquences virales dans l'ADN cellulaire et produisent les mêmes protéines virales ( soit petit T et T moyen) que la lignée originalement transplantée. Par contre, lorsque la lignée transplantée contient plusieurs insertions des séquences virales et qu'elle produit un grand T fonctionnel et des génomes viraux libres, les cellules tumorales obtenues ont subi des changements de sorte que le nombre d'inserts viraux est réduit et que ces cellules ne produisent plus un grand T fonctionnel ni ne libèrent de génome viraux libres (Lania et al., 1981). Il semble donc qu'il y ait sélection in vivo tout comme in vitro contre les cellules qui produisent un antigène grand T fonctionnel. Cependant, la sélection in vivo s'effectue beaucoup plus rapidement et de façon plus radicale puisque l'absence de grand T est un phénomène observé dans toutes les lignées tumorales obtenues qu'elles soient induites directement par l'ADN viral ou par transplantation de cellules transformées (Israel et al., 1980a,b; Lania et al., 1981). L'antigène grand T pourrait donc être nécessaire à l'établissement de la transformation alors que l'antigène T moyen serait suffisant, à lui seul, pour son maintien. La présence de l'antigène grand T dans les cellules transformées de façon stable pourrait même interférer dans l'expression de ce phénotype. L'hypothèse d'un rejet immunologique des cellules tumorales



produisant l'antigène grand T a déjà été envisagée puis rejetée puisque la sélection contre les cellules produisant l'antigène grand T peut également être observée in vitro (Lania et al., 1981). Il est possible cependant qu'en favorisant la production de génomes viraux libres, potentiellement infectieux, l'antigène grand T soit toxique pour les cellules. Sachant que grand T réprime la transcription des gènes viraux précoces, son inactivation pourrait en assurer un taux de transcription plus élevé et par le fait même une synthèse accrue des protéines transformantes. Il est également possible que les cellules ne produisant pas l'antigène grand T aient un avantage de croissance par rapport à celles qui en contiennent (Lania et al., 1981).

Quoi qu'il en soit toutes ces hypothèses impliquent qu'en induisant des tumeurs par l'injection de plasmides recombinants contenant deux copies du génome viral en tandem, chacune des deux séquences encodant la partie carboxy-terminale de l'antigène grand T devrait être interrompue d'une façon ou d'une autre.

Notre travail a donc consisté dans un premier temps à produire des plasmides multimériques à partir de recombinants contenant le génome viral complet ou encore sa partie transformante clonés dans le plasmide bactérien pBR322. Nous avons injecté un recombinant contenant un dimère du génome



viral à des rats nouveaux-nés dans le but d'induire le développement de tumeurs. Les séquences virales intégrées et les protéines virales produites par ces cellules tumorales ont ensuite été analysées. Finalement, nous avons montré qu'en injectant ce même dimère à des souris nues, il était possible d'induire une infection. Cette infection résulterait d'une recombinaison intramoléculaire du plasmide dimérique générant un génome viral infectieux.

## MATERIEL ET METHODES

### I. Virus:

Ce travail a été effectué en utilisant la souche A2 du virus du polyome, un variant du type sauvage produisant de grandes plaques (Fried et al., 1974).

### II. Plasmides recombinants:

Le plasmide pPAB contient le plus grand des deux fragments HindIII du génome viral, cloné dans le site HindIII du plasmide pBR322 (figure 2). Ce fragment d'ADN viral s'étend entre 44.6 et 1.8 unités sur la carte génomique. Il contient l'origine de réplication du génome viral ainsi que les séquences encodant les antigènes petit T, T moyen et l'extrémité N-terminale de l'antigène grand T (Bastin, 1980).

pPB21 contient le génome viral complet cloné dans le site BamHI de pBR322 (figure 3). Dans ce plasmide, la région précoce est ininterrompue et contient toutes les séquences encodant les antigènes petit T, T moyen et grand T (Gélinas et al., 1981).

pPE7 a été obtenu par recircularisation du plus grand des fragments résultant de la digestion de pPAB par l'enzyme PstI (figure 4). Il contient les séquences virales comprises entre 79.7% et 1.8% du génome viral (Bastin, 1981).

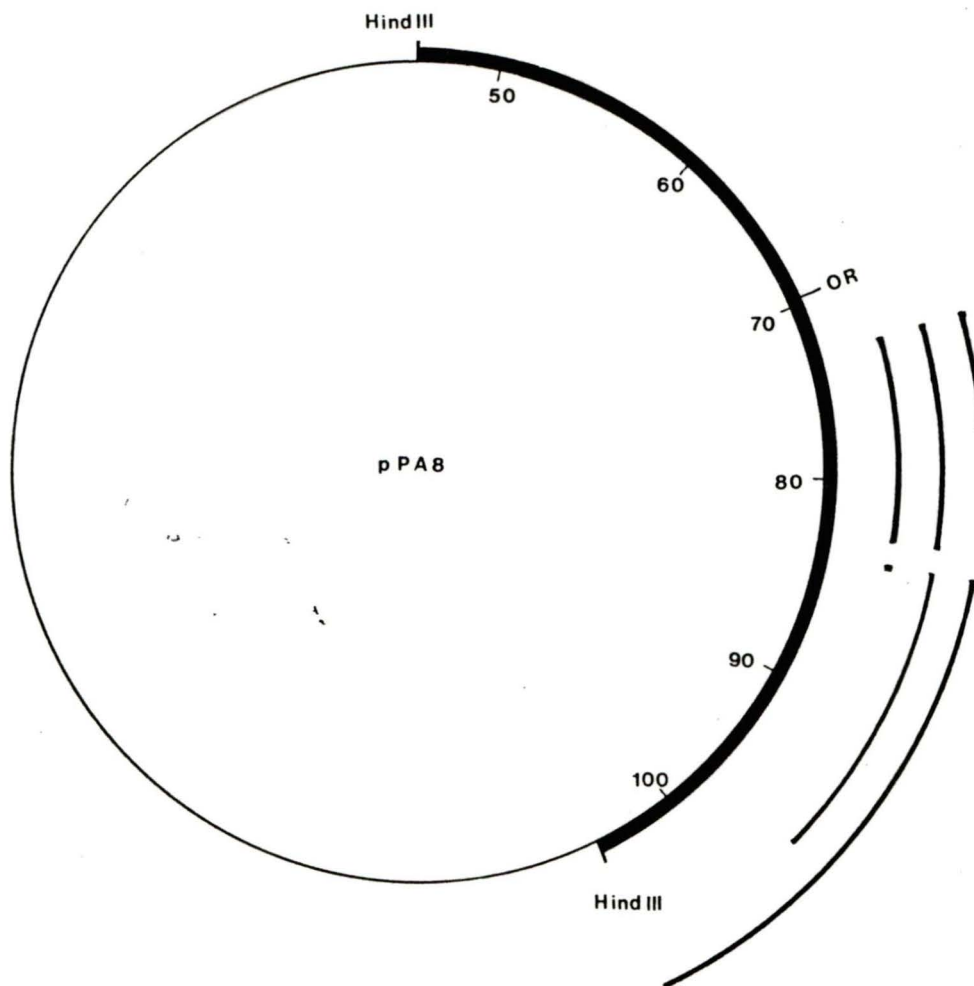


Figure 2. Carte physique du recombinant pPA8. Ce plasmide de 7392 p.b. contient le plus grand des deux fragments HindIII de la souche A2 de polyome cloné dans le site HindIII de pBR322. Il contient les séquences comprises entre 44.6 et 1.8 unités sur la carte génomique. On y retrouve l'origine de réplication ainsi que les séquences encodant les antigènes petit T, T moyen et la portion N-terminale de l'antigène grand T. Le trait fin représente les séquences plasmidiques alors que le trait épais représente l'insert d'origine virale. pPA8 peut conférer aux bactéries qui le portent la résistance à l'ampicilline et à la tétracycline.

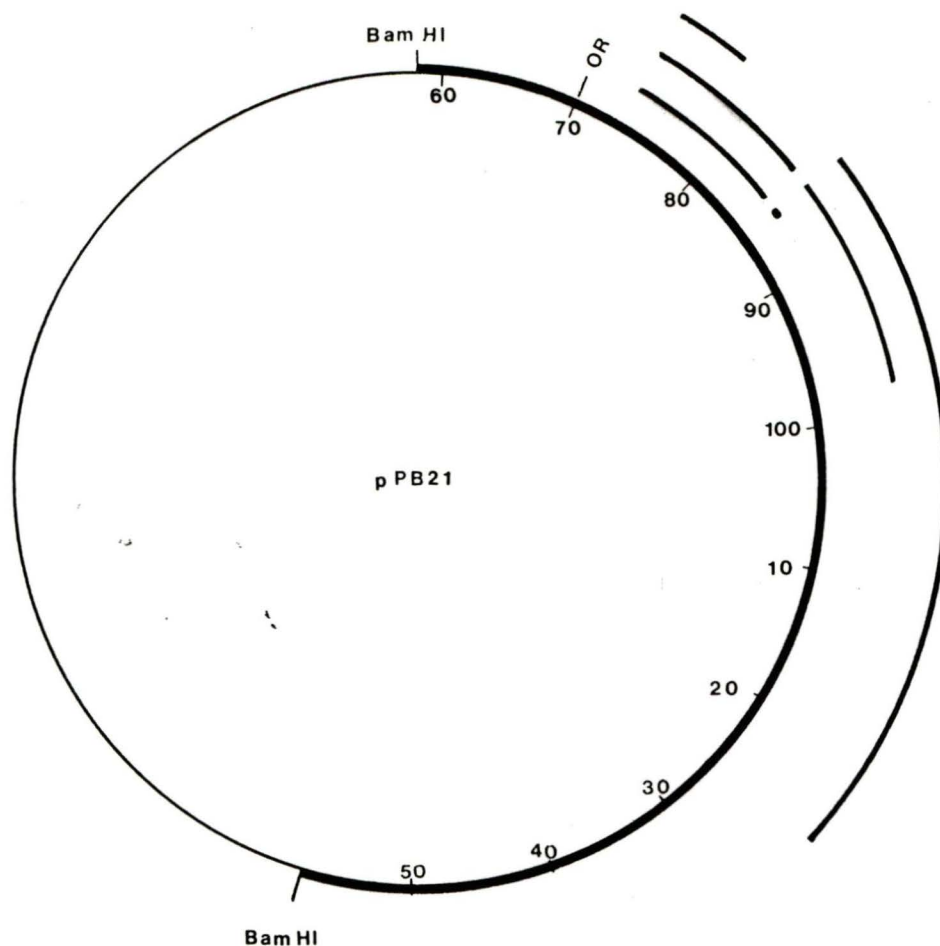


Figure 3. Carte physique du recombinant pPB21. Ce recombinant qui fait 9654 p.b. contient le génome viral complet cloné dans le site BamHI de pBR322. Le clonage interrompt la région tardive du génome viral, laissant la région précoce intacte. Le trait fin représente les séquences plasmidiques alors que le trait épais représente les séquences virales. pPB21 ne confère que la résistance à l'ampicilline.

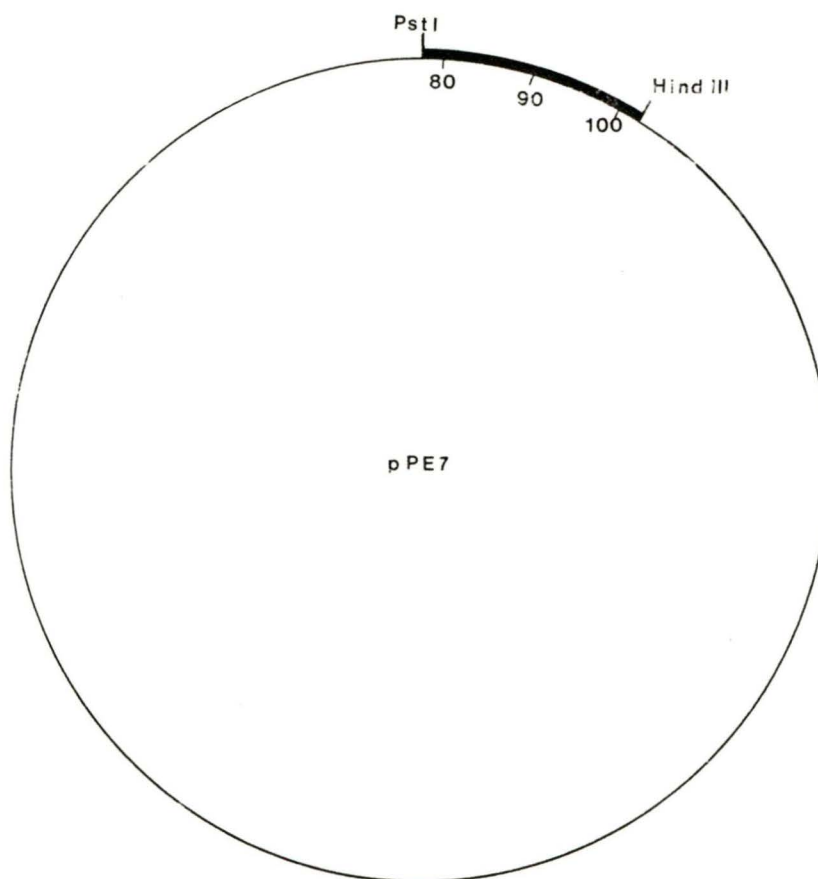


Figure 4. Carte physique du recombinant pPE7. Ce recombinant de 4755 p.b. a été obtenu par recircularisation du plus grand des fragments obtenus en digérant pPA8 par PstI. Il contient les séquences virales comprises entre le site PstI à 79,7 et le site HindIII à 1.8 unités sur la carte génomique. Le gène de résistance à l'ampicilline est inactivé par le clonage, alors que le gène de résistance à la tétracycline demeure intact. Le trait fin représente les séquences de pBR322 alors que le trait épais représente l'insert viral.

pPB22 (figure 8) est un dérivé de la forme dimérique de pPB21 qui a été partiellement digérée par l'enzyme BamHI avant d'être recircularisée de façon à conserver une seule copie du plasmide pBR322 lié à un tandem tête à queue du génome viral.

### III. Production des plasmides multimériques:

#### 1. Souches bactériennes:

Deux souches bactériennes différentes ont été employées; la souche X-1776 rec A+ de E. coli K12 (Curtiss et al., 1977) et la souche HB101 recA- de E. coli K12 (Boyer and Roulland-Dussoix, 1969). La souche X-1776 a été mise en culture dans du X-broth (2.5% tryptone, 0,75% d'extrait de levures, 5 mM MgSO<sub>4</sub>, 50 mM Tris pH 7,5) auquel on avait ajouté 0,1% de glucose, 100 µg/ml d'acide DL-α-ε diaminopimélique (Sigma) et 4 µg/ml de thymine. La souche HB101 a été mise en culture dans du L-broth (Luria-Bertani) auquel 0,1% de glucose a été ajouté.

#### 2. Transformation de la souche bactérienne E. coli X-1776:

Cette souche a été transformée suivant la méthode décrite par Norgard et al. (1978). Une culture fraîche dans 5 ml de milieu à 37 °C est initiée à partir d'une colonie isolée sur gélose. Le lendemain, 1,0 ml de cette culture est transféré dans 100 ml de milieu frais qui est ensuite incubé



à 37 °C avec agitation (350 rpm) jusqu'à ce que la culture atteigne une densité optique de 0,2 à 600 nm. On recueille ensuite les bactéries par centrifugation à 2 000 rpm durant 10 minutes (HB-4, Sorvall) à 4 °C. Le surnageant est décanté doucement et le culot de bactéries est resuspendu dans 35 ml de Tbf (100 mM RbCl, 45 mM MnCl<sub>2</sub>, 35 mM Kacétate, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 mM LiCl, 15% sucrose pH 5,8) puis laissé 5 minutes sur la glace. On recueille de nouveau les bactéries en centrifugeant à 2 000 rpm, pendant 10 minutes à 4 °C. Le surnageant est décanté et le culot est resuspendu dans 4 ml de Tbf. La suspension de bactéries est distribuée dans des tubes stériles de 1,5 ml en aliquots de 200 µl. Les bactéries ainsi préparées sont compétentes pour la transformation et peuvent être gelées dans un bain de glace sèche et d'isopropanol puis conservées à -70 °C pour au moins un an. Chaque transformation requiert 200 µl de bactéries. Il suffit avant chaque expérience de dégeler le nombre voulu d'aliquots en les laissant durant 30 minutes sur la glace. Il suffit ensuite d'ajouter 7 µl de diméthylsulfoxyde (DMSO), d'agiter doucement et de laisser sur la glace de 5 à 25 minutes en agitant à quelques reprises. L'ADN est ensuite ajouté (10 à 100 ng dans 1 à 10 µl TE; Tris 10 mM, EDTA 1 mM pH 7,9). Après avoir agité, on laisse sur la glace de 10 à 30 minutes. Les bactéries sont ensuite soumises à un choc par le froid pour 100 secondes dans un mélange de glace sèche et d'isopropanol. Elles sont ensuite dégelées à température



de la pièce et remises immédiatement sur la glace pour 10 minutes. Ce traitement est suivi d'un choc à la chaleur de 60 secondes à 42 °C. Les bactéries sont replacées sur la glace pour 2 minutes. 400  $\mu$ l de milieu sont ajoutés et le tout est incubé une heure à 37 °C sans agitation. Cette incubation permet aux bactéries de récupérer et de reprendre leur rythme de croissance. De plus, les bactéries ayant acquis un plasmide pourront commencer à exprimer les nouveaux facteurs de résistance acquis par le fait même. Les bactéries sont ensuite bien resuspendues puis étalées sur un milieu sélectif (50  $\mu$ l par boîte de pétri contenant du X-broth complet, 1,5% d'agar et 50  $\mu$ g/ml d'ampicilline ou 12,5  $\mu$ g/ml de tétracycline suivant le cas). Les boîtes sont ensuite incubées pendant 18 heures à 37 °C, après quoi les transformants peuvent être dénombrés.

### 3. Transformation de la souche bactérienne E. coli HB101 (Cohen et al., 1973).

Une culture d'une nuit est initiée dans 50 ml de L-broth contenant 0,1% de glucose. On peutensemencer le milieu frais à partir d'une colonie fraîchement isolée sur gélose ou encore par dilution (1:100) d'une culture liquide saturée conservée à 4 °C depuis plusieurs semaines. Les bactéries sont cultivées à 37 °C sans agitation. Le lendemain cette culture est de nouveau transférée dans du milieu frais (dilution 1:100). Chaque transformation nécessite 2,0 ml de culture bactérienne. Le nouvel inoculum est incubé à 37 °C

avec agitation (250 rpm) jusqu'à l'obtention d'une densité optique de 0,6 à 600 nm. Les bactéries sont recueillies par centrifugation pendant 10 minutes à 4 000 tours à 4 °C, puis resuspendues dans la moitié du volume initial de la culture, d'une solution de  $\text{CaCl}_2$  50 mM. La suspension est laissée 15 minutes sur la glace. Ce traitement au chlorure de calcium permet d'obtenir des bactéries compétentes, c'est à dire plus aptes à l'acquisition d'ADN exogène. Les bactéries sont de nouveau recueillies par centrifugation 10 minutes à 4 000 tours à 4°C. Le culot est cette fois resuspendu dans un dixième du volume initial. Les bactéries sont alors prêtes pour la transformation: 200  $\mu\text{l}$  de la suspension sont mélangés à 100  $\mu\text{l}$  de TCM (10 mM  $\text{CaCl}_2$ , 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM Tris pH 7,5) contenant 10 à 100 ng d'ADN puis laissés 15 minutes sur la glace. Le mélange est ensuite transféré 10 minutes à température de la pièce avant qu'on y ajoute 500  $\mu\text{l}$  de milieu et qu'on l'incube à 37°C sans agitation. Après cette période, les bactéries sont bien resuspendues, étalées sur milieu solide (2,5% Penassay [antibiotic medium 2; Gibco], 0,8% NaCl, 0,1% glucose) contenant 50  $\mu\text{g/ml}$  d'ampicilline ou 12,5  $\mu\text{g/ml}$  de tétracycline selon le cas, et incubées pendant 18 heures à 37 °C.

#### 4. Extraction des plasmides:

Les plasmides des transformants de la souche E. coli X-1776 ont d'abord été transférés dans 10 ml de milieu puis

incubés à 37 °C pendant 16 à 18 heures. 1,5 ml des cultures saturées ont ensuite été réensemencés dans 150 ml de milieu frais et incubés à 37 °C avec agitation jusqu'à ce que la culture atteigne une densité optique de 0,6 à 600 nm. Les plasmides ont alors été amplifiés en présence de 12,5 µg/ml de chloramphénicol pendant 15 heures, puis extraits en utilisant la méthode de lyse alcaline rapide de Birnboim et Doly (1979). Après précipitation à l'éthanol, ils ont été resuspendus dans 200 µl de TE, puis dialysés pendant une nuit à 4 °C dans du TE. Les plasmides ainsi obtenus ont été utilisés pour transformer la souche HB101.

Les transformants de la souche HB101 ont été amplifiés en culture de nuit de 30 ml. Les plasmides ont été extraits individuellement ou regroupés par cinq (6,0 ml de chaque culture) suivant la méthode décrite par Birnboim et Doly (1979).

Les plasmides recombinants d'intérêt ont été purifiés par centrifugation à l'équilibre dans un gradient de chlorure de césium tel que décrit par Maniatis et al. (1982).

Les enzymes de restriction nécessaires à ce travail ont été obtenus d'Amersham ou de Boehringer-Mannheim Canada et utilisés selon les recommandations des fabricants.

#### IV. Induction de tumeurs par injection de plasmides recombinants:



L'activité biologique des plasmides recombinants peut être évaluée entre autres par leur potentiel tumorigène in vivo. L'ADN linéarisé par un enzyme de restriction est injecté à la base du cou de rats Fischer (Charles River Canada Inc.) le jour de leur naissance. Chaque injection comprend 2 µg d'ADN plasmidique contenu dans 50 µl de tampon phosphate (PBS A; phosphate buffer saline 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 6,8). Les rats sont ensuite observés deux fois par semaine. Les tumeurs apparaissent sous forme de masses palpables localisées au site d'inoculation.

#### V. Etablissement des lignées tumorales:

Lorsque la tumeur atteint environ 3 cm de diamètre, elle est extraite de l'animal le plus stérilement possible. La masse tumorale est rincée abondamment à trois reprises dans du Tris-salin (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5 mM glucose, 25 mM Tris, 0,0015% rouge phénol pH 7,4) puis réduite en petits morceaux à l'aide de ciseaux à dissection. A deux reprises on resuspend les morceaux dans du Tris-salin et on les laisse sédimenter pendant cinq minutes avant de décantier le liquide. La tumeur émincée est ensuite transférée dans un flacon à trypsinisation (Bellco). On lui fait subir trois trypsinisations (100 ml trypsine 0,06% dans du Tris-salin) avec agitation à 37 °C. Après chaque trypsinisation le liquide est décanté et filtré à travers une mousseline stérile, ajouté à 50 ml de sérum de veau puis

conservé sur la glace. Après la troisième trypsinisation, les cellules sont centrifugées pendant 5 minutes à 1 000 rpm, puis resuspendues dans 10 ml de DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium) contenant 10% de sérum de veau, 2% de fongizone (amphotéricine B, 2,5 µg/ml), et 1% d'antibiotique (Streptomycine 0,01%, pénicilline 100 unités/ml). Une fraction de la suspension cellulaire est diluée 1:3 dans du bleu de trypan (0,5% bleu de trypan, 0,85% NaCl) avant que les cellules ne soient comptées. La coloration au bleu de trypan permet d'évaluer le nombre de cellules vivantes, ces dernières demeurant incolores alors que le colorant pénètre les cellules mortes. Les cellules sont ensuite distribuées dans des falcons de 75 cm<sup>2</sup> à raison de 5X10<sup>4</sup> cellules par récipient et conservées dans un incubateur à 37 °C (10% CO<sub>2</sub>).

#### VI. Analyse des séquences virales intégrées dans l'ADN chromosomique des cellules tumorales:

##### 1. Extraction d'ADN cellulaire:

Pour chacune des lignées tumorales les cellules sont cultivées jusqu'à confluence dans 10 falcons de 75 cm<sup>2</sup>. Le milieu est retiré et les cellules sont rincées à deux reprises dans du PBS préchauffé à 37°C. Les cellules sont ensuite lysées par l'addition de 1 ml de tampon A (10 mM NaCl, 10 mM EDTA, 10 mM Tris, 0,5% SDS, pH 7,9) contenant 50 µg/ml de protéinase K, laquelle agit comme inhibiteur des

DNases. Le tampon contenant la protéinase K est incubé 1 heure à 37 °C avant d'être ajouté aux cellules ce qui permet à la protéinase K de s'autoactiver. Les contenants sont agités doucement, puis on laisse agir le tampon durant 10 minutes à la température de la pièce, après quoi on transfère les lysats dans un tube stérile que l'on laisse agiter doucement 12 heures à 37°C ou toute une nuit à la température de la pièce. On ajoute ensuite un volume de phénol contenant 0,1% de 8-hydroxyquinoline et saturé en tampon B (500 mM Tris, 10 mM EDTA, 10 mM NaCl, 0,5% SDS pH 7,9) pour extraire les protéines du mélange. Le tout est agité pendant une heure à la température de la pièce et centrifugé 5 minutes à 2 500 rpm. La phase supérieure est transférée dans un autre tube puis traitée comme précédemment avec un mélange de phénol-chloroforme-alcool isoamylique 25:24:1. Elle est ensuite dialysée pendant 12 heures dans 100 volumes de tampon C (50 mM Tris, 10 mM EDTA, 10 mM NaCl pH 7,9) à la température de la pièce. Durant cette période le tampon de dialyse est renouvelé fréquemment. Le RNA est digéré en présence de 50 µg de RNase et 5 mM de MgCl<sub>2</sub> au cours d'une dialyse de 4 heures dans 100 volumes de tampon C à 37 °C. La réaction est ensuite arrêtée par l'ajout de 0,5% de SDS et de 50 µg/ml de protéinase K. Le tout est dialysé pendant 12 heures à 37 °C dans du tampon C, puis extrait au phénol et au phénol-chloroforme-alcool isoamylique avant d'être dialysé dans du tampon D (10 mM Tris, 0,5 mM EDTA, 10 mM NaCl pH 7,9)



pendant une heure à la température de la pièce puis pendant 4 jours à 4 °C. La concentration d'ADN de l'extrait est ensuite évaluée à partir de sa densité optique à 260 nm.

## 2. Extraction d'ADN de petit poids moléculaire (Hirt, 1967)

Cette technique permet d'extraire spécifiquement les petites molécules d'ADN circulaires non associées à l'ADN chromosomique des cellules. Les cellules sont mises en culture dans des pétris de 100 mm de diamètre à 37 °C. Facultativement, à 40 % de confluence les cellules peuvent être mises en présence de 0,03 µg de mitomycine (mitomycin-C Sigma) par ml de milieu pour une période de 24 heures. La mitomycine provoque des bris dans l'ADN, favorisant l'excision des génomes viraux intégrés dans l'ADN cellulaire. Les cellules sont ensuite lavées une fois à la versène avant d'être mises en présence de milieu frais. Le lendemain, le milieu est enlevé et les cellules sont lysées en présence de 0,8 ml de TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 8,0) contenant 0,6% de SDS pendant 10 minutes à la température de la pièce. Les lysats sont recueillis dans des tubes SB405 (rotor SB405, ISA), ajustés à une concentration finale de 1,0 M en NaCl et conservés au moins 6 heures à 4 °C. Le pH des extraits doit demeurer légèrement alcalin. On les centrifuge ensuite pendant 60 minutes à 4 °C à une vitesse de 20 000 rpm. De cette façon, l'ADN cellulaire forme un réseau insoluble qui



se retrouve dans le culot, alors que les petites molécules libres demeurent dans le surnageant. On recueille ce dernier et on lui fait subir 2 extractions au phénol-chloroforme, puis une extraction au chloroforme. L'ADN est précipité par l'ajout de 2 volumes d'éthanol suivi d'une période de 12 heures à -20 °C. Il est ensuite récupéré après 15 minutes de centrifugation à 4 000 rpm avant d'être resuspendu dans du TE.

### 3. Transfert d'ADN sur filtre de nitrocellulose (Southern, 1975)

10 µg d'ADN cellulaire sont digérés par différents enzymes de restriction. Les fragments obtenus sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 0,7%. La migration se fait en présence de tampon Tris-acétate (40 mM Tris-acétate, 2 mM EDTA, pH 7,9). Le gel est coloré durant 45 minutes dans une solution de bromure d'éthidium (2 µg/ml). Il est ensuite trempé pendant une heure à 37 °C dans une solution contenant 0,2M de NaOH et 0,5 M NaCl, ce qui provoque la dénaturation de l'ADN, puis pendant une heure à la température de la pièce dans une solution neutralisante (0,5 M Tris, 0,5 M NaCl pH 7,6). Le transfert de l'ADN se fait en présence de SSC 20X (3 M NaCl, 0,3 M citrate de sodium ajusté à un pH de 7,5 avec une solution 3 M NaCl, 0,3 M acide citrique) sur un filtre de nitrocellulose préalablement trempé pendant 10 minutes dans de l'eau distillée et pendant 20 minutes dans du tampon SSC 20X. Le montage utilisé pour le transfert est décrit par

Maniatis et al. (1982). Après le transfert, le filtre est séché durant 2 heures à 37 °C, puis l'ADN y est fixé par cuisson pendant 2 heures, sous vide, à 80 °C.

4. Hybridation du filtre à une sonde radioactive  
(Chartrand et al., 1981):

Après cuisson, le filtre est réhydraté par un trempage de 10 minutes dans du tampon SSC 6X, puis transféré dans une solution Denhart 10X (0,1% polyvinylpyrrolidone, 0,1% Ficoll 0,1% albumine de veau dans du tampon SSC 3X) et incubé pendant 2 heures à 68 °C avec agitation. Le filtre est ensuite préhybridé durant 2 heures à 68 °C dans une solution Denhart 10X contenant 0,1% de SDS et 80 µg/ml d'ADN de sperme de saumon fragmenté par sonication puis dénaturé à la chaleur. Le filtre est ensuite hybridé pendant 60 heures à 68 °C en présence de 3 ml de la solution de préhybridation contenant  $5,0 \times 10^6$  cpm de sonde radioactive préalablement dénaturée à la chaleur (10 minutes à 100 °C) puis placée sur la glace. Le filtre est ensuite lavé à 68 °C 3 fois durant 30 minutes dans la solution Denhart 10X contenant 0.1 % de SDS, 3 fois durant 30 minutes dans du tampon SSC 1X contenant 0.1% SDS, 2 fois durant 30 minutes dans du tampon SSC 0.3 X contenant 0.1% SDS, et finalement durant 10 minutes dans du tampon SSC 2X à la température de la pièce. Le filtre est ensuite séché pendant 2 heures à 37 °C puis exposé à un film

Kodak XAR-5 à -70 °C.

#### 5. Préparation d'une sonde radioactive

Les sondes sont préparées par réaction de "nick translation" dans un volume final de 50  $\mu$ l comprenant 25  $\mu$ Ci de 2 déoxyribonucléotides différents marqués au  $^{32}$ P (Amersham), 20  $\mu$ M des deux déoxyribonucléotides manquants froids, 10 mM de 2-mercaptoéthanol, 10 mM Tris pH 8.0, 5mM  $MgCl_2$ , 0.05% d'albumine (BSA, Sigma) ainsi que 0.1  $\mu$ g d'ADN. On introduit des bris dans l'ADN en incubant le mélange 10 minutes à 15 °C en présence de 600 pg de DNase (Boehringer). La DNase est préalablement activée deux heures sur la glace dans une solution 10 mM Tris pH 8.0. Pour marquer l'ADN, on ajoute 5 unités de polymérase (Kornberg DNA polymerase: Boehringer) et on laisse la réaction procéder 45 minutes à 15 °C. On arrête la réaction en ajoutant 10  $\mu$ l d'une solution d'EDTA 0.2M. L'EDTA complexe les ions  $Mg^{++}$  essentiels à l'activité de la polymérase. Le mélange est ensuite passé sur une colonne de séphadex G-50 et élué avec du tampon TE (10mM Tris, 1mM EDTA pH=8.0) afin de séparer l'ADN marqué des triphosphates libres. La sonde est conservée à 4 °C.

#### VII Injection de plasmides recombinants à des souris nues

Le potentiel infectieux des plasmides recombinants peut être évalué par injection à des souris nues. Ces mutants (nu/nu) n'ont pas de thymus et ont par le fait même un



système immunitaire déficient (Flanagan, 1966; Pantelouris, 1968). L'ADN préalablement linéarisé par un enzyme de restriction est ensuite injecté de façon sous-cutanée à des animaux nouveaux-nés. Chaque injection contient 2.0 ug d'ADN recombinant. Les tumeurs se manifestent par l'apparition d'une masse palpable au site d'inoculation. Par contre une infection par le virus du polyome se manifeste par un retard dans la croissance de l'animal; on obtient alors des souris naines.

#### VIII Mise en évidence des séquences virales dans les cellules de souris nues

##### 1 Extraction de l'ADN des reins

La méthode est sensiblement la même que celle utilisée pour l'extraction d'ADN à partir de cellules en culture. Les reins de l'animal sont prélevés aseptiquement, rincés dans du PBS (phosphate buffer saline) et incubés toute une nuit à 4 °C dans du tampon A (10 mM NaCl, 10 mM EDTA, 10mM Tris pH 7.9, 0.5% SDS) contenant 400 µg/ml de protéinase K. Le lendemain, les reins sont émincés puis agités pendant 36 heures à la température de la pièce après quoi les protéines sont extraites par deux traitements au phénol et un traitement au chloroforme-alcool isoamylique 24:1. La phase aqueuse est dialysée durant 3 jours dans du tampon C à la température de la pièce puis traitée à la RNase (50 µg/ml) en présence de 5mM MgCl<sub>2</sub> à 37 °C. Le tout est ensuite dialysé



durant 12 heures à 37 °C dans du tampon C en présence de 0.5 % de SDS, traité au phénol, au phénol-chloroforme-alcool isoamylique 25:24:1, et finalement dialysé pendant 4 jours dans du tampon D à 4 °C.

2. Le transfert de l'ADN à un filtre de nitrocellulose, la préhybridation et l'hybridation à une sonde radioactive ont été réalisés suivant les méthodes décrites dans le cas d'ADN extrait à partir des lignées tumorales.

## RESULTATS

### I. Construction des plasmides multimériques

L'intérêt que nous portons à la relation pouvant exister entre le phénotype des cellules transformées par le virus du polyome et le mode d'intégration du génome viral dans l'ADN cellulaire nous a amenés à construire des plasmides multimériques à partir de recombinants contenant différentes portions du génome viral. De tels plasmides multimériques peuvent être facilement obtenus par utilisation du système de recombinaison génétique de certaines bactéries (Hobom and Hogness, 1974; Bedbrook and Ausubel, 1976). Le plasmide est d'abord introduit dans la souche X-1776 de la bactérie E. coli, dont le système de recombinaison génétique est complet et fonctionnel (Willetts and Clark, 1969; Willetts and Mount, 1969; Willetts et al., 1969). Ce système de recombinaison assure la formation de multimères par recombinaison entre des plasmides plus petits. Les molécules générées contiennent un nombre entier de copies du plasmide unitaire liées en tandem tête à queue. On retrouvera donc dans une colonie résultant d'une bactérie transformée un mélange de plasmides contenant un nombre variable de copies du plasmide de départ. Ce mélange est ensuite utilisé pour transformer la souche bactérienne E. coli HB101. Cette souche est rec A- et par le fait même incapable de recombinaison génétique. Comme au cours de la transformation

chaque bactérie n'acquiert qu'un seul plasmide et que cette bactérie ne peut produire que des molécules contenant le même nombre de copies de l'unité monomérique que celui qu'elle a initialement acquis, on réussit ainsi à séparer et à stabiliser les constituants du mélange de départ. Il ne reste qu'à caractériser les oligomères contenus dans chacun des transformants indépendants.

#### 1. Formes multimériques des recombinants pPAB et pPB21

Ce procédé a été appliqué en utilisant les plasmides recombinants pPAB et pPB21 (figures 1 et 2). Le tableau #1 donne un résumé des formes oligomériques obtenues après stabilisation dans la souche HB101 de E. coli. Dans chaque cas, le multimère contenant le plus grand nombre de copies du plasmide monomérique est un trimère. Le nombre de copies effectivement contenues dans un multimère donné a été déterminé par une série de digestions partielles et complètes avec des enzymes de restriction reconnaissant un ou deux sites dans le monomère. La figure 5 illustre les patrons de digestion obtenus pour les monomères, dimères et trimères de pPAB et pPB21 après différents temps de digestion avec l'enzyme SalI qui ne reconnaît qu'un site dans ces plasmides. On peut constater que la digestion partielle des dimères génère en plus du dimère linéarisé une bande correspondant au plasmide monomérique. De même, la digestion partielle des plasmides trimériques permet de produire des fragments

Tableau 1. Formes oligomériques obtenues après stabilisation dans la souche E. coli HB101

Plasmides utilisés pour transformer la souche rec+ <u>E. coli</u> X-1776	Poids Moléculaires	Plasmides obtenues dans <u>E. coli</u> HB101							
		Monomère		Dimère		Trimère		n-mère	
pPAB	4878 Kd	20/36	55.5%	14/36	39.0%	2/36	5.5%	-	
pPAB dimère	9756 Kd	2/25	8.0%	19/25	76.0%	3/25	12.0%	1/25	4.0%
pPAB trimère	14634 Kd	11/44	25.0%	6/44	13.5%	27/44	61.5%	-	
pPB21	6372 Kd	13/30	43.0%	15/30	50.0%	2/30	6.7%	-	
pPB21 dimère	12744 Kd	5/30	16.6%	18/30	60.0%	-		-	
pPB21 trimère	19116 Kd	11/30	37.0%	11/30	37.0%	-		-	

Les différents multimères ont été caractérisés d'après leur migration sur gel d'agarose 0.7% suite à une extraction rapide par la méthode de Birnboim et Doly (1979).



Figure 5. Caractérisation des formes multimériques de pPA8 et pPB21.

A. Digestion des oligomères de pPA8 par SalI qui ne reconnaît qu'un site dans le monomère. 4  $\mu$ g de chacun des multimères ont été incubés à 37°C en présence de SalI dans un volume final de 80  $\mu$ l. Après 5, 10, 20 et 60 minutes, un aliquot de 20  $\mu$ l a été prélevé et mis en présence d'un volume équivalent de chloroforme pour arrêter la réaction. 5  $\mu$ l de la phase aqueuse ont ensuite été mis sur gel d'agarose 0,7%.

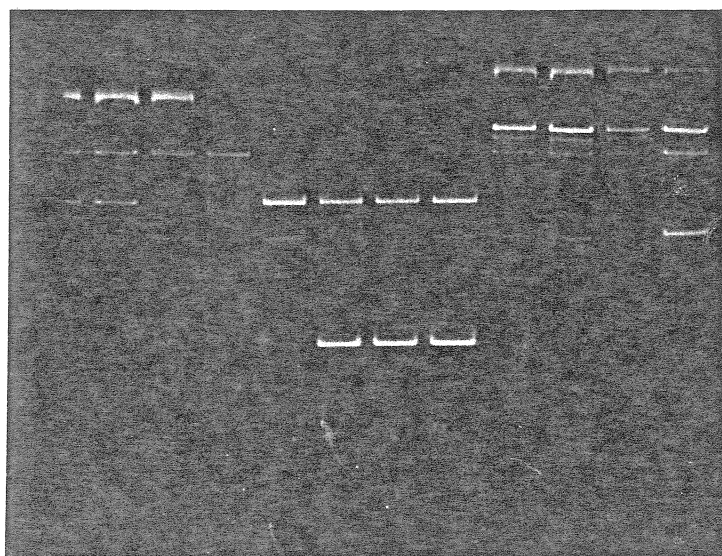
1. dimère digéré 5 minutes
2. dimère digéré 10 minutes
3. dimère digéré 20 minutes
4. dimère digéré 60 minutes
5. monomère digéré 5 minutes
6. monomère digéré 10 minutes
7. monomère digéré 20 minutes
8. monomère digéré 60 minutes
9. trimère digéré 5 minutes
10. trimère digéré 10 minutes
11. trimère digéré 20 minutes
12. trimère digéré 60 minutes

B. Digestion des oligomères de pPB21 par SalI qui ne reconnaît qu'un site dans le monomère. 4  $\mu$ g de chacun des oligomères ont été digérés 60 minutes dans un volume de 80  $\mu$ l. Après quoi, 10  $\mu$ l de chacune des digestions ont été mis sur gel.

1. monomère non digéré
2. monomère digéré
3. dimère non digéré
4. dimère digéré
5. trimère non digéré
6. trimère digéré

**A**

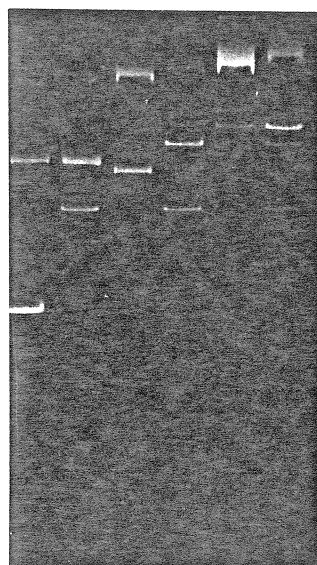
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12



trimère linéaire  
- dimère linéaire  
- monomère linéaire

**B**

1 2 3 4 5 6



trimère linéaire  
- dimère linéaire  
- monomère linéaire

correspondant aux monomère, dimère et trimère linéarisés. Lorsqu'on utilise un enzyme reconnaissant deux sites dans le plasmide monomérique, une digestion partielle permet d'observer tous les fragments prévisibles pour une molécule contenant plusieurs séquences unitaires liées en tandem tête à queue. Ceci est illustré à la figure 6 par une digestion partielle du trimère de pFAB par l'enzyme HindIII.

Afin de vérifier s'il était possible d'obtenir des plasmides multimériques contenant plus de trois copies du monomère, nous avons repris l'expérience en introduisant cette fois les dimères et les trimères dans la souche rec+ E. coli X-1776. On retrouve dans le tableau #1 les différents oligomères obtenus ainsi que leurs proportions respectives. Alors que nous nous attendions à générer des tétramères, des hexamères, des octomères et ainsi de suite à partir des plasmides dimériques, nous n'avons obtenu qu'un tétramère du recombinant pFAB, les autres oligomères appartenant à la catégorie des monomères, dimères ou trimères.

De même, espérant construire des hexamères et des nanomères à partir des plasmides trimériques, nous n'avons réobtenu que des monomères, dimères et trimères. Il est à noter qu'à une seule exception près (soit le cas du trimère de pPB21), l'oligomère retrouvé en plus grande quantité après stabilisation dans la souche rec A- correspond à celui qui a

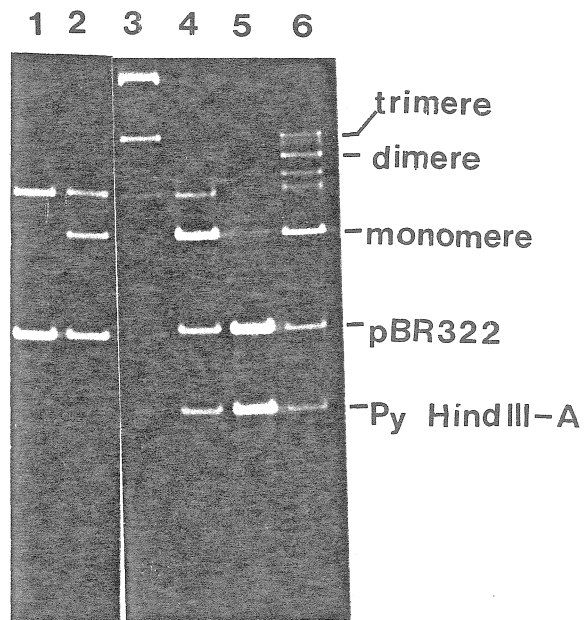


Figure 6. Caractérisation de la forme trimérique de pPAB par digestion partielle. 4  $\mu$ g de plasmide ont été digérés par SalI durant une heure à 37°C dans un volume final de 80  $\mu$ l. La même quantité de plasmide a également été digérée deux heures à 37°C en présence de vingt unités de l'enzyme HindIII. Après quoi, les réactions ont été arrêtées par traitement au chloroforme. 5  $\mu$ l de chaque digestion ont été déposés sur un gel d'agarose 0.7%.

1. monomère non digéré
2. monomère digéré par SalI
3. trimère digéré par SalI
4. monomère digéré partiellement par HindIII
5. monomère digéré complètement par HindIII
6. trimère digéré partiellement par HindIII



été initialement introduit dans la souche rec+. Il semble également que plus un oligomère contient de copies du plasmide monomérique, plus sa fréquence d'apparition est faible. Nous nous sommes demandés si ceci était dû au fait qu'il y a une limite au nombre de copies que l'on peut retrouver dans un multimère, au fait que les plasmides contenant plus de quatre copies du monomère sont en trop faible proportion dans le mélange pour être détectés après la transformation bactérienne ou encore si le nombre maximal de copies d'un plasmide que l'on puisse obtenir dans un multimère ne dépend pas de la taille du monomère.

## 2. Formes multimériques du recombinant pPE7

Afin de répondre à ces dernières questions, nous avons produit des plasmides multimériques à partir du recombinant pPE7 (figure 4), qui est deux fois plus petit que pPB21. Il a alors été possible comme la figure 7 l'illustre, d'obtenir des plasmides contenant jusqu'à 6 copies du monomère. Le plus gros multimère obtenu à partir de pPE7 a donc un poids moléculaire comparable à celui du trimère de pPB21, le plus gros multimère que nous en ayons obtenu.

## II Arrangement des séquences dimériques dans les tumeurs induites chez les rats nouveaux-nés

### 1. Construction du recombinant pPB22

L'étude de l'arrangement des séquences du génome du

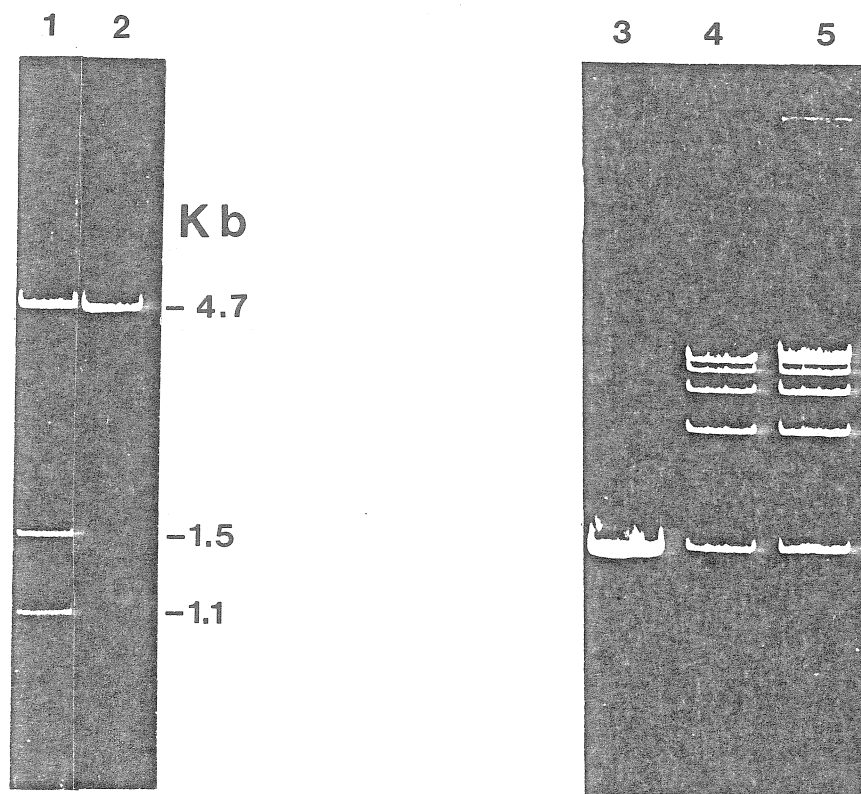


Figure 7. Caractérisation des multimères de pPE7. Les différents plasmides ont été digérés par l'enzyme PstI avant que les fragments soient séparés sur un gel d'agarose 1%.

1. pPA8 après digestion complète donnant trois fragments de 4755, 1551 et 1086 p.b.
2. pPE7 après une digestion complète.
3. pentamère de pPE7 après une digestion complète.
4. pentamère de pPE7 après une digestion partielle.
5. hexamère de pPE7 après une digestion partielle.

virus du polyome dans l'ADN des cellules des tumeurs induites in vivo a permis de constater dans tous les cas rapportés que la portion distale de la région précoce a été réarrangée de façon à ce que l'antigène grand T ne puisse pas être produit. Suite à ces résultats il a été suggéré qu'il y aurait sélection contre les cellules produisant l'antigène grand T in vivo, de façon à ce qu'on ne retrouve jamais une protéine fonctionnelle dans les cellules tumorales (Israel et al., 1980a, b; Lania et al., 1981; Lania et al., 1981). Ces résultats ont été obtenus suite à l'injection de virions ou du génome viral à des animaux. Ils impliquent que l'induction de tumeurs par injection de plasmides recombinants contenant deux génomes viraux en tandem amènera l'inactivation d'une façon ou d'une autre de chacune des deux séquences encodant l'extrémité carboxyterminale de la protéine grand T. C'est ce que nous avons voulu vérifier en utilisant le recombinant pPB22, obtenu après modification du dimère de pPB21 (Figure 8). En effet, le dimère de pPB21 contient en alternance le plasmide pBR322 lié en son unique site BamHI au génome viral complet linéarisé au même site de restriction, une autre séquence plasmidique et une autre séquence virale. Après digestion partielle de cette molécule dimérique avec BamHI on génère les molécules suivantes: le dimère linéarisé de 19308 paires de bases (pb), une séquence plasmidique liée à deux génomes viraux (14946 pb), le monomère de pPB21 (9654 pb), le génome viral (5292 pb), et le

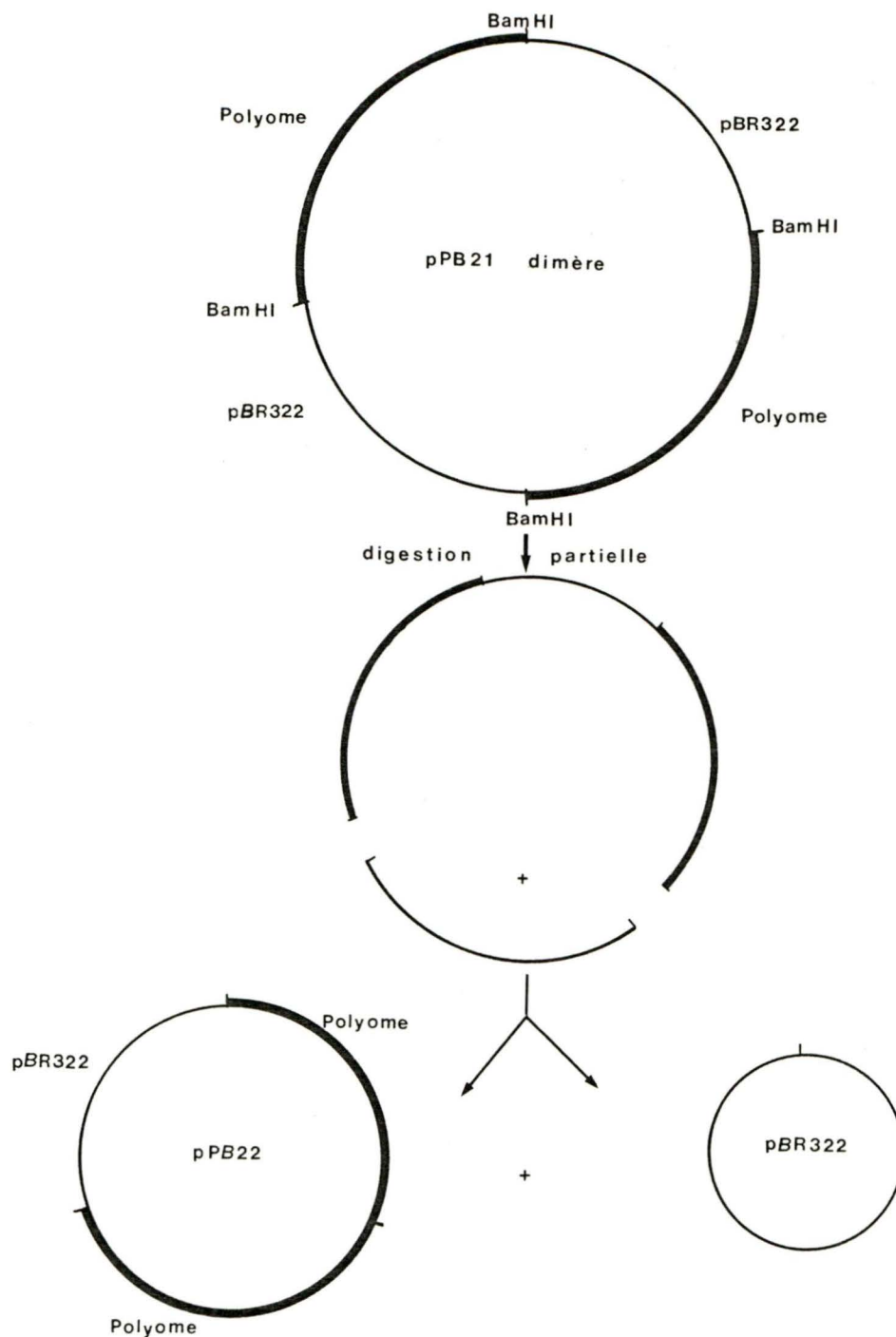


Figure 8. Construction du recombinant pPB22. pPB22 a été obtenu à partir du dimère de pPB21 auquel une copie de pBR322 a été enlevée par digestion partielle avec l'enzyme BamHI.



plasmide pBR322 (4362 pb). Ce mélange de molécules linéaires a ensuite été soumis à l'action de l'enzyme T4 DNA ligase afin d'obtenir des molécules circulaires qui ont été utilisées pour transformer la souche bactérienne E. Coli HB101. Parmi les transformants nous avons recherché ceux qui portaient la molécule de 14946 pb. Nous avons ainsi obtenu pPB22, une molécule contenant une copie du plasmide pBR322 liée à un tandem tête à queue du génome viral.

## 2. Tumorigénicité du recombinant pPB22

Le potentiel tumorigène d'un plasmide recombinant peut être évalué en l'injectant à des rats nouveaux-nés. Il a été établi que l'ADN doit d'abord être linéarisé, les recombinants injectés sous la forme d'hélice superenroulée n'ayant aucun potentiel tumorigène (Gélinas et al., 1981). pPB22 a donc été linéarisé par l'enzyme de restriction Sall, qui ne reconnaît qu'un site dans les séquences du recombinant provenant de pBR322. De cette façon, on obtient une molécule linéaire dans laquelle le tandem des séquences virales demeure intact et flanqué de part et d'autre de séquences plasmidiques. Par contre la digestion du dimère de pPB21 par n'importe quel enzyme aurait amené la séparation des deux génomes viraux, tous les sites de restriction étant présents un nombre pair de fois dans ce plasmide.

2.0 µg de pPB22 linéarisé par l'enzyme Sall ont été injectés à la base du cou de rats Fisher le jour de leur

naissance. La figure 9 présente la cinétique d'apparition des tumeurs en fonction du nombre de semaines écoulées depuis l'injection. Les résultats obtenus pour pPB22 sont illustrés et comparés avec ceux obtenus lors de l'injection des recombinants contrôle pPAB coupé par HindIII et pPB21 digéré par BamHI. Avec 8 animaux sur 27 ayant développé une tumeur en quatre mois d'observation, la tumorigénicité du recombinant pPB22 est comparable à celle des plasmides ne contenant qu'une copie du génome viral. Cette tumorigénicité se situe entre 30% et 50% des animaux injectés qui développent une tumeur. L'injection du plasmide pBR322 comme témoin négatif n'a pas provoqué l'apparition de tumeur. Ceci confirme que l'apparition des tumeurs est due aux séquences virales présentes dans les recombinants injectés.

### 3. Séquences virales intégrées dans l'ADN cellulaire des différentes lignées tumorales.

Des huit tumeurs obtenues par injection de pPB22, sept ont été établies en culture avec succès. Nous avons donc voulu vérifier si ces différentes lignées tumorales contenaient une région précoce du génome viral encore intacte. Mais avant de voir si ces lignées contenaient toutes les séquences encodant l'antigène grand T et pouvaient potentiellement produire la protéine, nous avons voulu vérifier le nombre de sites d'insertion du recombinant injecté, dans l'ADN des différentes lignées tumorales. En

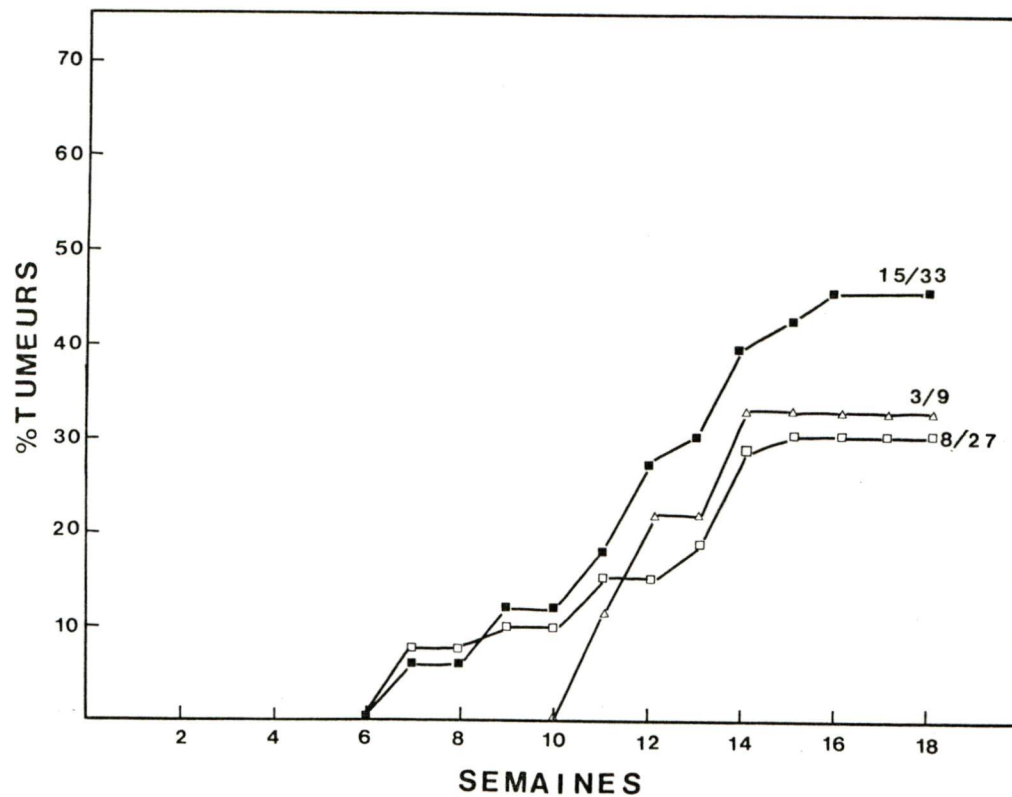


Figure 9. Potentiel tumorigène du recombinant pPB22. 2.0  $\mu$ g de la forme linéarisée de chacun des plasmides contenus dans 50  $\mu$ l de tampon phosphate ont été injectés à la base du cou des rats le jour de leur naissance. La cinétique d'apparition des tumeurs induites par pPB22 est comparée à celle des plasmides témoins pPA8 et pPB21.

- pPA8 coupé par HindIII.
- △ pPB21 linéarisé par BamHI.
- pPB22 linéarisé par Sall.

effet, il est plus difficile d'analyser l'arrangement des séquences virales dans l'ADN cellulaire lorsqu'elles y sont présentes en plusieurs sites différents. Nous avons extrait l'ADN de chacune des sept lignées tumorales établies, qui a ensuite été digéré par l'enzyme de restriction BglII. Cet enzyme ne reconnaît aucun site dans pPB22. Il ne coupe donc que dans les séquences d'origine cellulaire. Les fragments générés ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 0,7%, transférés sur un filtre de nitrocellulose et hybridés à une sonde radioactive (pPB21 marqué par "nick translation"). On peut ainsi considérer que chaque bande illuminée par la sonde correspond à une insertion des séquences virales dans l'ADN cellulaire. De cette façon, nous avons pu établir que les lignées tumorales T1 et T3 contenaient un seul insert des séquences virales alors que les lignées T2, T4, T5, T7 et T8 en contenaient plusieurs (Figure 10).

L'enzyme de restriction HindIII reconnaît deux sites dans le génome du virus du polyome générant des fragments de 3,0 et 2,2 Kb. Le premier (fragment HindIII-A) contient la partie proximale de la région précoce et est détectable aussi bien dans les tumeurs induites in vivo que dans les lignées transformées in vitro. Il renferme les séquences encodant les antigènes petit T et T moyen ainsi que la portion N-terminale de la protéine grand T. Le second (fragment HindIII-B) contient la portion distale de la région précoce



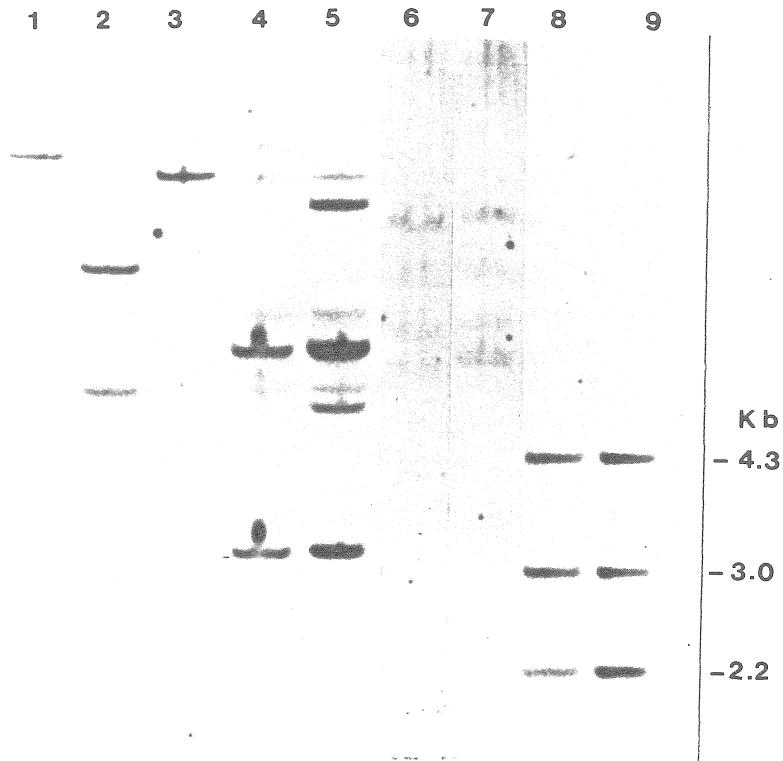


Figure 10. Analyse des séquences virales intégrées dans les lignées tumorales par l'enzyme BglII. 10  $\mu$ g d'ADN cellulaire ont été digérés par BglII. Les fragments ont été séparés sur un gel d'agarose 0,7%, transférés sur un filtre de nitrocellulose et hybridés au plasmide pPB21 marqué par nick translation.

1. pPB22 SalI/T1.
2. pPB22 SalI/T2.
3. pPB22 SalI/T3.
4. pPB22 SalI/T4.
5. pPB22 SalI/T5.
6. pPB22 SalI/T7.
7. pPB22 SalI/T8.
8.  $2 \times 10^{-5}$   $\mu$ g de marqueur (pBR322 linéarisé, fragment HindIII-A de polyome, fragment HindIII-B de polyome).
9.  $10^{-4}$   $\mu$ g de marqueur.

qui encode uniquement l'extrémité C-terminale de l'antigène grand T. Ce fragment est parfois présent dans les cellules transformées in vitro. Cependant, il est invariablement absent des tumeurs induites in vivo. Dans le but de vérifier si nos différentes lignées tumorales avaient conservé une région précoce intacte nous avons recherché la présence du fragment HindIII-B de 2,2 kb. Sur les blots génomiques obtenus après digestion de l'ADN cellulaire par l'enzyme HindIII, le fragment Hind III-B de 2,2 kb est détectable dans six des sept lignées dont les lignées T1 et T3 qui ne contiennent qu'une insertion des séquences virales (Figure 11). Il est à remarquer que pour ces deux lignées l'intensité des fragments HindIII A et B est comparable, suggérant que ces deux fragments se retrouvent en nombre équivalent de copies dans les insertions virales; ces deux lignées ont été analysées plus en détail avec différents enzymes reconnaissant un nombre variable de sites dans les séquences du recombinant pPB22. La figure 12 représente une carte physique du recombinant pPB22 linéarisé au site Sall ainsi que les différents fragments générés dans ce recombinant par les enzymes de restriction Bam HI, EcoRI, HindIII et PvuII. Les fragments illuminés sur blot génomique, après digestion avec ces mêmes enzymes, sont également indiqués permettant de délimiter grossièrement les séquences virales présentes. Il est à noter que pour les deux lignées tumorales, après digestion de l'ADN cellulaire

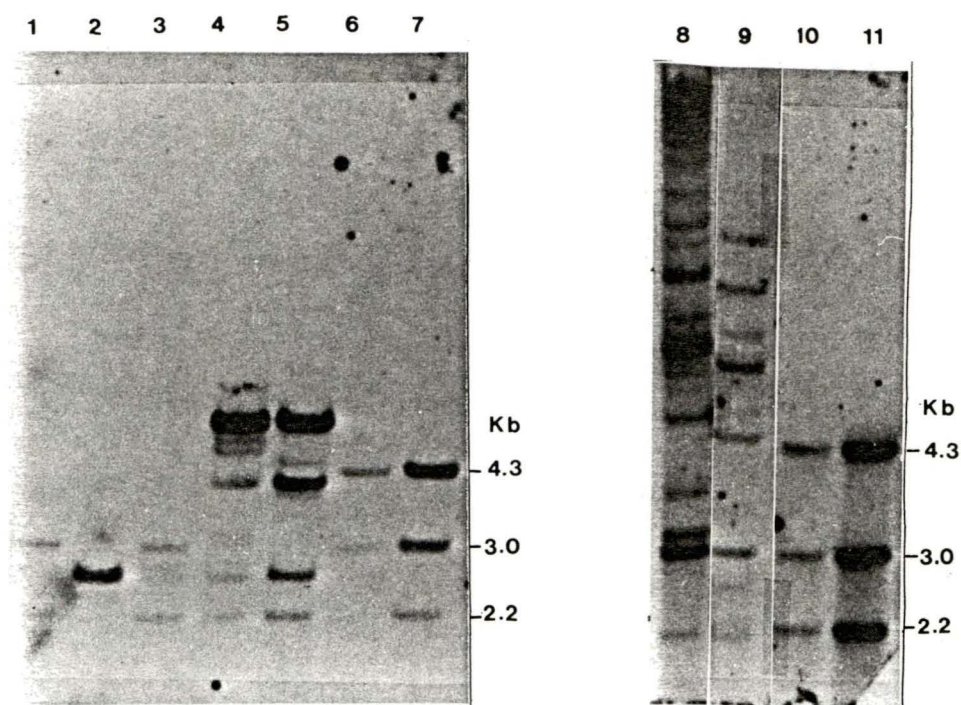


Figure 11. Analyse des séquences virales intégrées dans les lignées tumorales par l'enzyme HindIII. 10 µg d'ADN de chacune des lignées ont été digérés par HindIII avant de subir une électrophorèse sur gel d'agarose 0,7%. Les fragments ont ensuite été transférés sur filtre de nitrocellulose et hybridés à une sonde virale.

1. pPB22 SalI/T1
2. pPB22 SalI/T2
3. pPB22 SalI/T3
4. pPB22 SalI/T4
5. pPB22 SalI/T5
6.  $2 \times 10^{-5}$  µg marqueur (voir fig. 10)
7.  $10^{-4}$  µg marqueur
8. pPB22 SalI/T7
9. pPB22 SalI/T8
10.  $2 \times 10^{-5}$  µg marqueur
11.  $10^{-4}$  µg marqueur

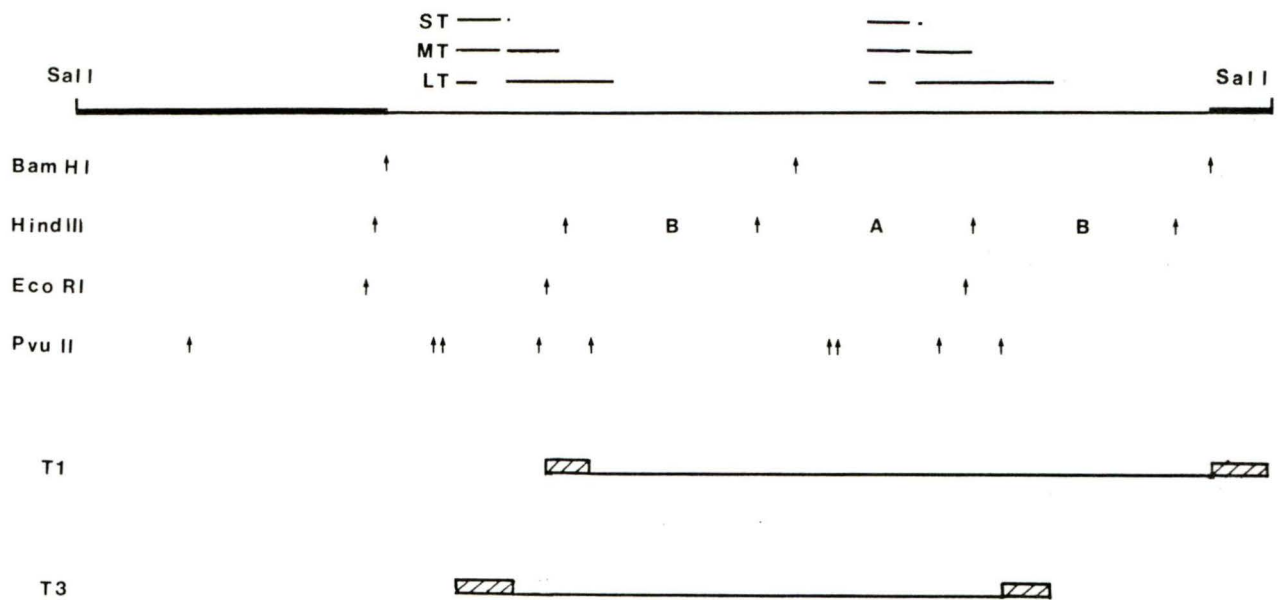


Figure 12. Délimitation des séquences virales présentes dans les lignées tumorales T1 et T3. pPB22 y est représenté linéarisé à son unique site SalI. Le trait épais représente les séquences de pBR322 alors que le trait mince représente les séquences virales. Les deux régions précoces et les protéines qu'elles encodent sont illustrées. Les sites reconnus par BamHI, HindIII, EcoRI et PvuII sont indiqués. Pour chacune des deux lignées tumorales T1 et T3 les séquences virales présentes ont été déterminées par Southern blot après digestion de l'ADN cellulaire par différents enzymes de restriction. Les séquences présentes sont indiquées par un trait fin. Les zones d'incertitude, en hachuré, ont été délimitées entre le dernier site présent et le premier site absent.



par l'enzyme Sall, on ne détecte qu'une seule bande (non montré). Ceci confirme les résultats obtenus avec l'enzyme BglIII qui suggèraient la présence d'une seule insertion virale en plus d'indiquer que le site Sall a été perdu ou inactivé au cours de l'intégration du recombinant dans l'ADN cellulaire.

La compilation des résultats représentés dans cette figure permet d'obtenir les informations suivantes; dans le cas de la lignée tumorale T1, l'intensité des fragments HindIII A et B suggère qu'ils sont présents en un nombre de copies équivalent. L'enzyme BamHI qui ne reconnaît qu'un site dans le génome viral libère une bande correspondant à un génome viral complet. Cependant, l'enzyme Eco RI, qui ne reconnaît également qu'un site dans les séquences virales ne permet pas de détecter une telle molécule, suggérant qu'il ne reste qu'un site dans l'insert. Il semble donc qu'on ait au moins un génome viral sans réarrangement majeur, mais qu'il n'y ait pas de tandem complet du génome viral. Il semblerait que le fragment HindIII-B présent est précédé d'une partie proximale de la région précocée qui est intacte.

La lignée T3 semble également contenir les fragments HindIII A et B en quantités équimolaires. Dans ce cas, l'enzyme EcoRI génère une bande correspondant au génome viral complet. Il semble donc que la lignée tumorale T3 contiennent au moins un génome viral complet sans

réarrangement majeur. Cependant, il ne semble pas que le fragment HindIII-B présent soit lié à une partie proximale de la région précoce encore intacte.

Il n'est donc pas à exclure que la lignée tumorale T1 puisse contenir les séquences encodant l'antigène grand T, alors qu'il ne semble pas que ce soit le cas de la lignée T3.

#### 4. Détection de molécules libres dans les cellules tumorales

Le génome du virus du polyome peut se retrouver dans les cellules transformées non seulement sous la forme liée à l'ADN cellulaire, mais également sous forme libre. Il est maintenant généralement admis que l'antigène grand T est nécessaire à la production de ces molécules virales libres (Zouzas et al., 1977; Basilico et al., 1979; Colantuoni et al., 1980).

On peut donc observer le même phénomène de libération de molécules libres dans le cas où nos lignées tumorales contiennent effectivement une région du génome viral qui est intacte et permet aux cellules de produire un antigène grand T fonctionnel. Nous avons donc procédé à une extraction suivant la méthode de Hirt (1967) qui nous permet d'obtenir spécifiquement les molécules d'ADN de petit poids moléculaire qui ne sont pas intégrées dans l'ADN chromosomique. Les extraits ont été soumis à une électrophorèse sur gel

d'agarose, transférés sur un filtre de nitrocellulose et hybridés à une sonde radioactive. Aucune molécule libre n'a pu être détectée à l'intérieur des limites de la technique utilisée. (Figure 13). Il a également été impossible de mettre en évidence de protéine correspondant à l'antigène grand T dans les expériences d'immunoprécipitation réalisées à partir des cellules tumorales (résultat non montré). Il est donc probable qu'un réarrangement mineur des séquences virales empêche la production de l'antigène grand T dans les cellules tumorales. Ce réarrangement aurait pu se produire subséquentement ou encore au moment de l'intégration des séquences virales dans l'ADN cellulaire.

### III Activité du recombinant pPB22 chez les souris nues

La souris est l'hôte naturel chez lequel le virus du polyome se multiplie. Chez la souris nue, un mutant (Nu/Nu; Flanagan, 1966; Pantelouris, 1968) sans thymus dont le système immunitaire se trouve affecté, l'infection virale se manifeste par un arrêt de croissance. Les souris touchées demeurent naines. Chez ces mêmes souris l'injection de plasmides recombinants ne contenant que la partie transformante du génome viral provoque le développement de tumeurs, alors que ce phénomène est très rare chez les animaux appartenant au type sauvage. L'antigène grand T étant essentiel à la réplication du génome viral, la souris nue constitue un excellent système pour vérifier la

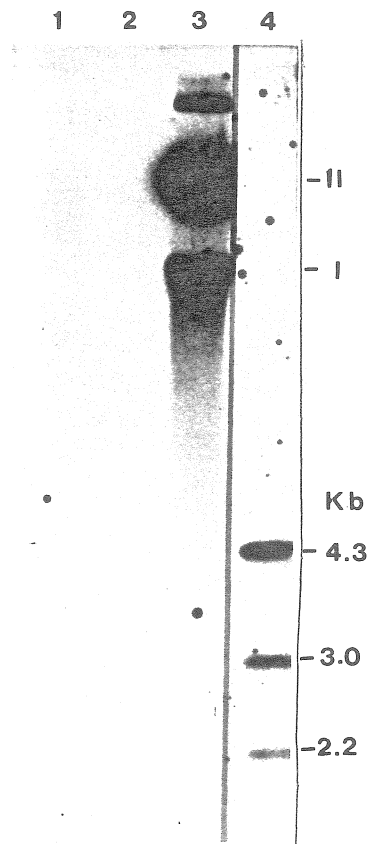


Figure 13. Détection de molécules libres dans les lignées tumorales: exemple de la lignée T1. L'extrait par la méthode de Hirt de l'équivalent de deux grands pétris confluents a été déposé sur gel d'agarose 0,7%, transféré sur filtre de nitrocellulose et hybridé à une sonde virale.

1. lignée T1 traitée 24 heures avec 0,03 ug/ml de mitomycine
2. lignée T1 non traitée
3.  $10^{-3}$   $\mu$ g pPB22 non digéré
4.  $10^{-4}$   $\mu$ g marqueurs linéaires (pBR322: 4.3 Kb; Py HindIII-A : 3.0 Kb; Py HindIII-B: 2,2 Kb)



fonctionnalité de l'antigène grand T encodée par le recombinant pPB22. Nous avons donc injecté 2  $\mu$ g du recombinant pPB22 linéarisé par l'enzyme Sall à quatre souris nues, le jour de leur naissance. Cinq semaines plus tard, une des quatre souris injectées était demeurée naine.

Les reins de chacune de ces souris ont été prélevés et l'ADN en a été extrait. Un vingtième de chaque extrait a été soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose 0,7% avant d'être transféré sur un filtre de nitrocellulose et hybridé à une sonde virale afin d'y détecter la présence de séquences virales. Chez les quatre souris, on a détecté la présence de bandes correspondant aux formes I et II du génome du virus du polyome (Figure 14). Le signal obtenu est toutefois plus intense dans le cas de la souris demeurée naine, donc qui présente des signes d'infection. Ces extraits d'ADN ont également été digérés par différents enzymes avant l'électrophorèse. Après digestion avec l'enzyme BamHI, on observe dans les quatre extraits une seule bande de 5.3 kb qui correspond à la longueur du génome du virus du polyome. Quand on digère par HindIII on génère deux bandes correspondant exactement aux fragments obtenus par digestion du génome viral. Dans les cas où la digestion n'a pas été complète, on peut également détecter une bande comigrant avec le génome viral linéarisé. (Figure 15).

Tous ces résultats suggèrent qu'une population homogène

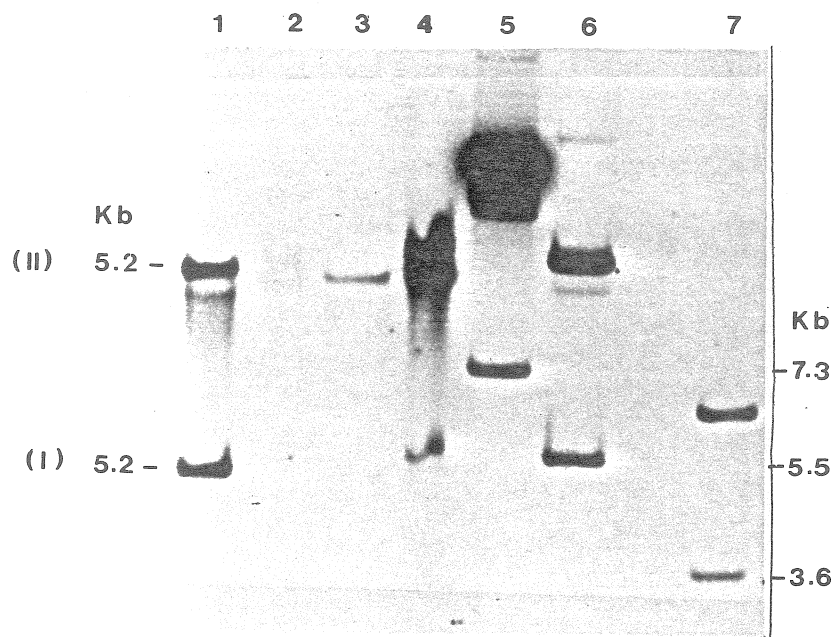


Figure 14. Détection de génomes viraux libres dans les reins de souris nues. Un vingtième de l'ADN extrait des reins de chacune des souris nues a été soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose 0,7% avant d'être transféré sur filtre de nitrocellulose et hybridé à une sonde virale.

1. souris 1 (naine)
2. souris 2
3. souris 3
4. souris 4
5. pPA8 non digéré (formes I et II: 7,3 Kb)
6. pMT3 non digéré (formes I et II: 5,5 Kb)
7. pAT153 non digéré (formes I et II: 3,6 Kb)

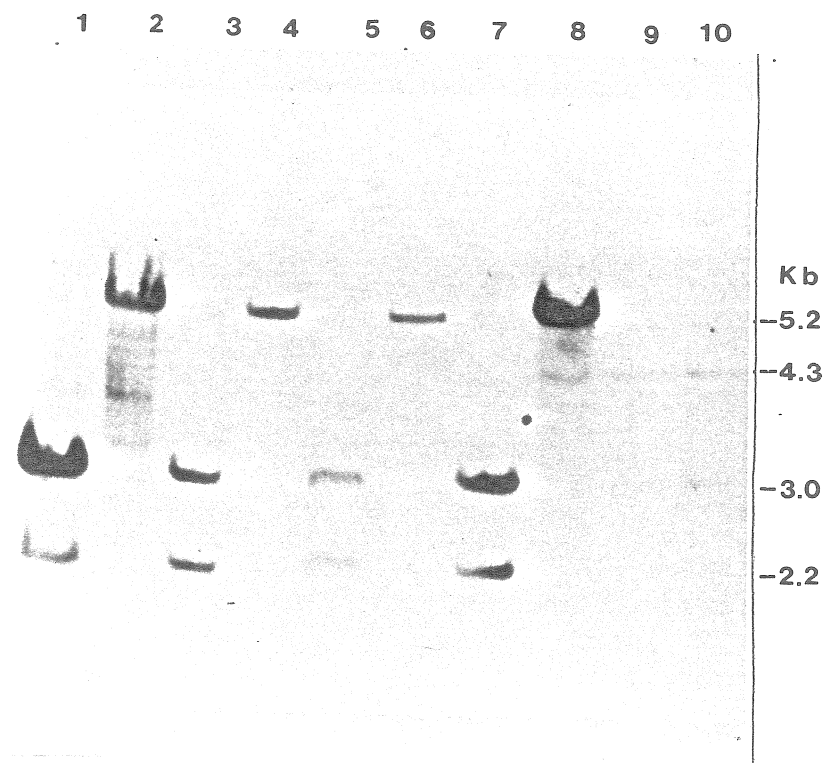


Figure 15. Caractérisation aux enzymes de restriction des génomes viraux présents dans les reins des souris nues. Un vingtième de chaque extrait d'ADN a été digéré par BamHI ou HindIII. Les fragments ont ensuite été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 0,7% et transférés sur filtre de nitrocellulose avant d'être hybridés à une sonde virale.

1. ADN souris 1 (naine) digéré par HindIII
2. ADN souris 1 digéré par BamHI
3. ADN souris 2 digéré par HindIII
4. ADN souris 2 digéré par BamHI
5. ADN souris 3 digéré par HindIII
6. ADN souris 3 digéré par BamHI
7. ADN souris 4 digéré par HindIII
8. ADN souris 4 digéré par BamHI
9.  $2,0 \times 10^{-5}$   $\mu$ g marqueurs (pBR322: 4,3 Kb; Py HindIII-A: 3,0 Kb; Py HindIII-B: 2,2 Kb)
10.  $10^{-4}$   $\mu$ g marqueurs

de molécules est produite dans les reins des souris nues auxquelles on a injecté le recombinant pPB22. Ces molécules correspondent, d'après leur poids moléculaire et leurs fragments de restriction au génome du virus du polyome. Ces génomes infectieux peuvent avoir été générés par recombinaison homologue à partir du tandem contenu dans le recombinant pPB22. Leur réplication dans les cellules de souris implique que les séquences du recombinant pPB22 encodent un antigène grand T fonctionnel.



## DISCUSSION

### I Construction des plasmides multimériques

Chez les bactéries, l'oligomérisation des éléments extrachromosomiques à réplication autonome est un phénomène relativement bien connu. Il a été observé aussi bien pour des plasmides colicinogéniques, que pour des plasmides d'autre nature ou encore des dérivés du bactériophage  $\lambda$ . Il a été observé aussi bien chez Proteus mirabilis que chez Escherichia coli (Bazaraal and Helinski, 1968; Hobom and Hogness, 1974; Heffron et al. 1975; Bedbrook and Ausubel, 1976). Chez E. coli, la formation de multimères requiert la présence du produit du gène *recA*. D'où l'idée généralement admise que la multimérisation résulte de la recombinaison homologue entre deux molécules plus petites (Hobom and Hogness, 1974; Bedbrook and Ausubel, 1976).

Par l'intermédiaire du système bactérien, nous avons réussi à produire des multimères de plasmides recombinants portant différentes portions du génome du virus du polyome. Comme celles qui ont été décrites précédemment, ces molécules contiennent un nombre entier de copies de l'unité monomérique, liées en tandem tête à queue. En effet, par digestion partielle avec un enzyme à site unique dans le monomère, on obtient des molécules correspondant au multimère linéarisé et à des molécules contenant toujours la valeur d'un monomère en moins. Une digestion complète génère les

fragments prévus pour la digestion du monomère.

Après l'oligomérisation, l'espèce moléculaire stabilisée la plus abondante dans la souche rec- demeure encore celle que l'on a initialement introduite dans la souche rec+ (tableau 1). Ainsi, à partir d'un monomère, on peut obtenir des dimères, trimères et ainsi de suite, mais le plasmide monomérique demeure le principal composant de la population moléculaire. De même à partir d'un plasmide dimérique, on peut générer des monomères, trimères et tétramères. Là encore, le dimère demeurera l'espèce la plus abondante. De plus, la fréquence d'apparition d'un multimère donné diminue à mesure que le nombre de copies du plasmide unitaire qu'il contient augmente. Cette distribution des plasmides peut s'expliquer si on considère le fait qu'un plasmide doit atteindre un nombre minimal de copies dans une bactérie rec+ avant que puisse subvenir un événement de recombinaison intermoléculaire générant une molécule multimérique. Le plasmide initial aura donc dû se répliquer avant que n'apparaissent les premiers oligomères. On peut même s'attendre à ce qu'il monopolise tous les sites de réplication disponibles. Son taux de réplication devrait donc être plus élevé que le taux de recombinaison intermoléculaire générant des dimères de la molécule de départ. La recombinaison des molécules dimériques obtenues entre elles ou encore avec l'unité de départ sera elle aussi soumise à la règle des concentrations respectives des

molécules impliquées. On peut donc s'attendre à ce que plus une molécule contient de copies du plasmide initial, plus son nombre dans la bactérie est réduit et plus ses chances de recombinaison avec d'autres molécules pour donner des oligomères plus gros sont restreintes.

Le fait que l'on puisse réobtenir des molécules plus petites à partir de multimères (par exemple, l'obtention de monomères et de dimères à partir de trimères) indique que le phénomène d'oligomérisation est réversible. Ces molécules plus petites peuvent résulter d'un événement de recombinaison intramoléculaire fragmentant un multimère en deux unités plus petites.

Le nombre maximum de copies que nous avons pu obtenir varie d'un plasmide de départ à l'autre. Le tableau 2 présente le nombre maximum de copies obtenues dans un multimère pour chacun des plasmides utilisés. On y cite également les résultats présentés par Bedbrook et Ausubel (1976). Il en ressort que quel que soit le poids moléculaire du plasmide de départ, le plus gros multimère obtenu a un poids moléculaire d'environ 20kd. Ceci revient à dire que plus le plasmide de départ est petit, plus le nombre de copies qu'on peut en obtenir dans un multimère est élevé. Toutefois, le fait que l'on ait pas obtenu, par exemple, de pentamères ou d'hexamères de pPAB et de pPB21 ne signifie pas

Tableau 2. Formes oligomériques obtenues en fonction du poids moléculaire de l'unité monomérique

Monomère	Poids Moléculaire	Nombre de copies dans le plus gros multimère obtenu	Poids Moléculaire
pPE7	3136 Kd	6	18816 Kd
pMB9 (Bedbrook and Ausubel, 1976)	3630 Kd	4 et +	18150 Kd
pPA8	4878 Kd	4	19512 Kd
pPB21	6372 Kd	3	19116 Kd



qu'il n'y en a pas eus de formés dans la souche rec<sup>+</sup>. Il est possible que ces multimères se soient retrouvés en quantité trop faible pour être détectables après transformation de la souche rec<sup>-</sup>. La souche rec-HB101 est parmi les différentes souches de E. coli qui présentent l'efficacité de transformation la plus faible (10<sup>5</sup> transformants/ $\mu$ g pBR322. Maniatis et al., 1982). Une souche recA<sup>-</sup> avec une meilleure efficacité de transformation et l'analyse d'un nombre plus élevé de transformants nous aurait peut-être permis de détecter de telles molécules. Il faut également considérer qu'une molécule de 40kd (poids moléculaire prévisible pour un hexamère de pPB21) a peut-être plus de difficulté à passer la membrane cellulaire qu'un plasmide de moins de 10Kd, ce qui diminuerait encore la probabilité de trouver une bactérie portant un tel multimère. Il est également possible que les plus gros multimères aient été perdus à cause de leur instabilité. Un tel phénomène a été rapporté pour une série de plasmides dont pBR322, le vecteur que nous avons utilisé (Summers and Sherratt, 1984). L'instabilité des multimères résulterait de leur nombre réduit de copies par cellules. Au moment de la division cellulaire, les plasmides présents en peu de copies seraient distribués asymétriquement entre les cellules filles, donnant lieu à l'apparition fréquente de bactéries ne portant plus de plasmides. Le plasmide est ainsi graduellement dilué et fini par être perdu, dans une population bactérienne dont la

majorité des membres ne portent plus de plasmide.

## II Arrangement des séquences dimériques dans les tumeurs induites chez les rats nouveaux-nés

Nous avons généré, par modification du dimère de pPB21, une molécule recombinante contenant deux génomes viraux complets en tandem. L'activité biologique de pPB22, dans l'essai de tumorigénicité in vivo, est comparable à celle de recombinants ne contenant qu'une copie du génome viral (pPB21) ou encore ne contenant que la partie proximale de la région précoce (pPA8). La présence de deux régions transformantes ne semble donc pas conférer un plus grand potentiel tumorigène à la molécule. Pas plus qu'elle n'assure une apparition plus précoce des tumeurs.

L'injection de pPB22 ne semble pas avoir permis non plus d'obtenir de lignée tumorale produisant la protéine grand T. Ce fait a été clairement établi pour les deux lignées tumorales ne contenant qu'un insert des séquences virales. L'une d'entre elles (T1) semble contenir une région précoce intacte, mais ne peut produire de génomes viraux libres, ni de protéine correspondant à l'antigène grand T. On peut supposer que l'absence de grand T résulte d'un réarrangement mineur des séquences virales, non détectable sur nos blots. Quant à la seconde lignée (T3), l'arrangement des séquences virales qu'on y trouve suggère que le fragment HindIII-B présent n'est pas précédé d'une partie proximale de la région

précoce, mais plutôt que le fragment HindIII-A encodant l'extrémité N-terminale de l'antigène grand T, se situe en 3' du fragment HindIII-B. L'absence d'une région précoce ininterrompue dans cette lignée implique qu'il ne peut y avoir synthèse d'un antigène grand T complet.

Dans le cas des cinq lignées tumorales contenant plus d'un insert du recombinant, l'analyse détaillée des séquences intégrées n'a pu être réalisée. Nous savons cependant que dans le cas d'une de ces lignées (T2), le fragment HindIII-B est absent. La lignée tumorale T2 ne contient donc pas les séquences encodant l'extrémité C-terminale de grand T et ne peut donc pas produire une protéine complète. Le fragment HindIII-B a été détecté dans les quatre autres lignées contenant plusieurs sites d'insertion des séquences virales. Mais nous ne savons pas si ces lignées se retrouvent dans le même cas que la lignée T1 et contiennent une région précoce sans réarrangement majeur détectable ou encore si comme pour la lignée T3, la partie proximale de la région précoce précédant le fragment HindIII-B a été interrompue. Une immunoprécipitation des protéines virales produites dans deux de ces lignées (T5 et T8, résultat non montré) n'a pas permis de détecter l'antigène grand T. Nous pouvons donc affirmer que cinq des sept lignées tumorales induites par un tandem de deux génomes viraux ne peuvent produire l'antigène grand T. Il est fort probable que ce soit également le cas des deux



lignées restantes. Ceci renforcerait l'hypothèse déjà émise suite aux résultats d'analyse des lignées tumorales induites avec une seule copie du génome viral, suggérant qu'il y aurait sélection in vivo contre les cellules produisant l'antigène grand T.

### III Activité du recombinant pPB22 chez les souris nues

Le virus du polyome se multiplie par l'intermédiaire de l'infection qu'il cause chez la souris. Cette infection peut être déclenchée aussi bien par un virion que par le génome viral seul et se manifeste par l'apparition, dans le sérum de l'animal, d'anticorps dirigés contre les constituants de la capside virale. L'animal ne semble pas affecté par la présence du virus. Par contre, chez la souris nue, un mutant immunodéficient, l'infection virale se manifeste de façon visible par un retard marqué dans la croissance.

C'est ce que nous avons observé chez une des quatre souris injectées avec le plasmide pPB22. L'infection observée implique qu'il y a eu formation de génomes viraux libres à partir du recombinant injecté. Ces molécules ont été vraisemblablement libérées suite à un événement de recombinaison homologue à l'intérieur du tandem complet des séquences virales contenues dans pPB22. L'environnement permissif que constitue la souris a ensuite permis la réplication de ces génomes viraux et le déclenchement du cycle infectieux. Des résultats semblables ont été



précédemment rapportés dans le cas de tests d'infectivité in vitro (Kelly et al., 1974; Perricaudet et al., 1977; Israel et al., 1979a; Chan et al., 1979; Fried et al., 1979). Ces expériences ont été réalisées à partir de tandems partiels du génome de l'adénovirus clonés dans le bactériophage  $\lambda$ , de différents hybrides adénovirus-SV40, contenant des tandems partiels du génome de SV40 et de monomères ou de dimères du génome de polyome clonés dans le plasmide pBR322 ou dans le bactériophage  $\lambda$ . Elles ont consisté à introduire ces molécules dans des cellules permissives pour le virus cloné et ont toutes mené aux mêmes conclusions: lorsqu'une copie complète et unique est liée au vecteur, on observe pas d'infection. Il faut que le génome viral soit précisément séparé du vecteur pour devenir infectieux. Lorsque le génome viral est présent en plus d'une copie, il y a infection qui résulte de l'excision d'un génome complet par recombinaison intramoléculaire. Ce phénomène est relativement efficace et sa fréquence semble être proportionnelle à l'étendue des séquences virales dupliquées. Dans le cas qui nous intéresse, la présence, dans pPB22, de deux génomes viraux complets en tandem nous assure une probabilité maximale de recombinaison pouvant libérer un génome viral libre susceptible d'engendrer un cycle infectieux.

Il a été possible de détecter la présence de molécules correspondant au génome viral libre non seulement dans les

reins de la souris naine mais également dans ceux des trois souris ne présentant pas de signe d'infection. Dans ces derniers cas, le génome viral est présent en plus petite quantité. Nous ne savons pas si cette différence est responsable de l'absence des signes d'infection. Nous ne savons pas non plus si les signes d'infection se seraient éventuellement manifestés plus tard, lorsque les génomes viraux libres auraient atteint une certaine quantité. Il a déjà été établi qu'il faut injecter environ  $10^{-4}$   $\mu$ g d'ADN circulaire pour obtenir une infection chez 50% des souris injectées ( $ID_{50}$  Israel et al., 1979a). En considérant la situation extrême où il n'y aurait pas de réplication des génomes libérés, il faudrait qu'il y ait un taux de recombinaison intramoléculaire de  $5 \times 10^{-5}$  dans les 2  $\mu$ g de plasmides injectés pour atteindre la valeur de l' $ID_{50}$ . En considérant qu'on peut détecter des génomes viraux dans toutes les souris injectées, même si une seule manifeste des symptômes d'infection, on peut dire que dans notre essai in vivo, la production de génomes viraux libres par recombinaison intramoléculaire est également très efficace.

Il semble que le virus puisse se propager aisément dans l'organisme de son hôte. En effet, nous avons détecté la présence de génomes viraux dans les reins des animaux alors que le plasmide a été inoculé à la base du cou des animaux naissants. Il a également été rapporté que l'injection de particules virales à des souris nues provoquait le

développement de virions dans le cerveau des animaux (McCance et al., 1983). L'injection d'une grande quantité de virions, toujours de façon sous-cutanée, à la base du cou, peut même provoquer l'apparition de tumeurs mammaires (Arya, 1982).

Cet essai nous a donc permis de reproduire in vivo un test d'infectivité pour les molécules recombinantes. En présence de duplication des séquences virales, il peut y avoir libération de génomes infectieux par recombinaison intramoléculaire. Nous pouvons également dire que le recombinant pPB22 encode un antigène grand T fonctionnel puisque ce dernier est essentiel au cycle infectieux du virus. Les réarrangements mineurs empêchant la production de grand T dans certaines de nos lignées tumorales de rat sont donc survenus au moment de l'intégration du génome viral ou subséquemment. Ils ne résultent pas de l'injection de molécules déjà défectives.

## REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé grâce à la collaboration de nombreuses personnes que je tiens à remercier sincèrement.

Ces remerciements vont tout particulièrement au Dr Marcel Bastin, mon directeur de thèse, pour ses conseils et ses encouragements ainsi qu'à toute son équipe.

Je tiens à remercier Carole Bergeron et Johanne Toutant pour leur aide à la culture des cellules ainsi que Céline Gélinas qui m'a initiée à plusieurs des techniques que j'ai utilisées.

Je tiens finalement à remercier le Fonds de la Recherche en Santé du Québec pour son soutien financier.



## REFERENCES

1. Arya, S.K. 1982. Organization of polyoma virus DNA in mammary tumours of athymic mice. *J. Gen. Virol.* 63: 405-415.
2. Basilico, C., S. Gattoni, D. Zouzas, and G. Della Valle. 1979. Loss of integrated viral DNA sequences in polyoma-transformed cells is associated with an active viral A function. *Cell* 17: 645-659.
3. Basilico, C., D. Zouzas, G. Della Valle, S. Gattoni, V. Colantuoni, R. Fenton, and L. Dailey. 1980. Integration and excision of polyoma virus genomes. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 44: 611-620.
4. Bastin, M., D. Bourgaux-Ramoisy, and P. Bourgaux. 1980. Biological properties of polyoma DNA fragments cloned in plasmid pBR322. *J. Gen. Virol.* 50: 179-184.
5. Bastin, M. 1981. Molecular cloning in plasmid pBR322 giving altered expression of the tetracycline resistance gene. *J. Gen. Microbiology* 123: 187-191.
6. Bazaral, M., and D.R. Helinski. 1968. Characterization of multiple circular DNA forms of colicinogenic factor E1 from *Proteus mirabilis*. *Biochemistry* 7: 3513-3519.
7. Bedbrook, J.R., and F.M. Ausubel. 1976. Recombination between bacterial plasmids leading to the formation of plasmid multimers. *Cell* 9: 707-716.
8. Birg, F., R. Dulbecco, M. Fried, and R. Kamen. 1979. State and organization of polyoma virus DNA sequences in transformed rat cell lines. *J. Virol.* 29: 633-648.
9. Birnboim, H.C., and J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Res.* 7: 1513-1523.
10. Boyer, H.W., and D. Roulland-Dussoix. 1969. A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 41: 459-472.
11. Chan, H.W., M.A. Israel, C.F. Garon, W.P. Rowe, and M.A. Martin. 1979. Molecular cloning of polyoma virus DNA in *Escherichia coli*: Lambda phage vector system. *Science* 203: 887-892.

12. Chartrand, P., N. Gusew-Chartrand, and P. Bourgaux. 1981. Integrated polyoma genomes in inducible permissive transformed cells. *J. Virol.* 39: 185-195.
13. Cogen B. 1978. Virus-specific early RNA in 3T6 cells infected by a ts a mutant of polyoma virus. *Virology* 85: 222-230.
14. Cohen, S.N., A.C.Y. Chang, and L. Hsu. 1973. Non chromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 69: 2110-2114.
15. Colantuoni, V., L. Dailey and C. Basilico. 1980. Amplification of integrated viral DNA sequences in polyoma transformed cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77: 3850-3854.
16. Crawford, L.V., A.K. Robbins, and P.M. Ananicklin. 1974. Location of the origin and terminus of replication in polyoma virus DNA. *J. Gen. Virol.* 22: 133-142.
17. Curtiss, R. III, M. Inoue, D. Pereira, J.C. Hsu, C. Alexander, and L. Rock. 1977. Construction and use of safer bacterial host strains of recombinant DNA research. In *Molecular cloning of recombinant DNA*. W.A. Scott and R. Werner editor. New York. Academic Press pp 99-114.
18. Della Valle, G., R. Fenton, and C. Basilico. 1981. Polyoma large T antigen regulates the integration of viral DNA sequences into the genome of transformed cells. *Cell* 23: 347-355.
19. Eckhart, W., M.A. Huntchinson, and T. Hunter. 1979. An activity phosphorylating tyrosine in polyoma T antigen immunoprecipitates. *Cell* 18: 925-933.
20. Fine, R., M. Mass, and W.T. Murakami. 1968. Protein composition of polyoma virus. *J. Mol. Biol.* 36: 167-177.
21. Flanagan, S.P. 1966. Nude, a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse. *Genet. Res.* 8: 295-309.
22. Frearson, P.M., and L.V. Crawford. 1972. Polyoma virus basic proteins. *J. Gen. Virol.* 14: 141-155.



23. Fried, M., B.E. Griffin, E. Lund, and D.L. Roberson. 1974. Polyoma virus - a study of wild type, mutant and defective DNAs. *C.S.H.S. Quant. Biol.* 39: 45-62.
24. Fried, M., B. Klein, K. Murray, P. Greenaway, J. Tooze, W. Bolland, and C. Weissmann. 1979. Infectivity in mouse fibroblasts of polyoma DNA integrated into plasmid pBR322 or lambdoid phage DNA. *Nature* 279: 811-816.
25. Gelinas, C., L. Bouchard, and M. Bastin. 1981. Tumorigenic activity of cloned polyoma virus DNA in newborn rats. *Experientia* 37: 1074-1075.
26. Gibson, W. 1974. Polyoma virus proteins: a description of the structural proteins of the virion based on polyacrylamide gel electrophoresis and peptide analysis. *Virology* 62: 319-336.
27. Griffin, B.E., M. Fried, and A. Cowie. 1974. Polyoma DNA: A physical map. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 71: 2077-2081.
28. Griffin, B.E., and C. Maddock. 1979. New classes of viable deletion mutants in the early region of polyoma virus. *J. Virol.* 31: 645-656.
29. Griffin, B.E., Y. Ito, U. Novak, N. Spurr, S. Dilworth, R. Pollack, K. Smith, and D. Rifkin. 1980. Early mutants of polyoma virus (dl8 and dl23) with altered transformation properties: is polyoma virus middle T antigen a transforming gene product. *C.S.H.S. Quant. Biol.* 44: 271-282.
30. Gross, L. 1953 a. A filterable agent, recovered from AK leukemic extracts, causing salivary gland carcinoma in C3H mice. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 83: 414-421.
31. Gross, L. 1953 b. Neck tumors, or leukemia, developing in adult C3H mice following inoculation, in early infancy, with filtered (Berkefeld N), or centrifuged (144,000xg), AK leukemic extracts. *Cancer* 6: 948-957.
32. Hassel, J., W. Topp, D. Rifkin, and P. Moreau. 1980. Transformation of rat embryo fibroblasts by cloned polyoma virus DNA fragments containing only part of the early region. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77: 3978-3982.

33. Heffron, F., R. Sublett, R.W. Hedges, A. Jacob, and S. Falkow. 1975. Origin of the TEM beta-lactamase gene found on plasmids. *J. Bacteriol.* 122: 250-256.
34. Herrick, R.M., M. Fried, and M.D. Waterfield. 1975. Non-histone virions proteins of polyoma: characterization of the particle proteins by tryptic peptide analysis using ion-exchange columns. *Virology* 66: 408-419.
35. Hirt, B. 1967. Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell cultures. *J. Mol. Biol.* 26: 365-369.
36. Hobom, G., and D.S. Hogness. 1974. The role of recombination in the formation of circular oligomers of the  $\lambda$  dv1 plasmid. *J. Mol. Biol.* 88: 65-87.
37. Hutchinson, M.A., T. Hunter, and W. Echart. 1978. Characterization of T antigens in polyoma infected and transformed cells. *Cell* 15: 65-77.
38. Israel, M.A., D. Simmons, S. Hourihan, W. Rowe, and M.Martin. 1979. Interrupting the early region of polyoma virus DNA enhances tumorigenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76: 3713-3717.
39. Israel, M.A., H.W. Chan, W.P. Rowe, and M.A. Martin. 1979a. Molecular cloning of polyoma virus DNA in *Escherichia coli*: plasmid vector system. *Science* 203: 883-887.
40. Israel, M.A., D.F. Vanderryn, M.L. Meltzer, and M.A. Martin. 1980a. Characterization of polyoma viral DNA sequences in polyoma-induced tumor cell lines. *J. Biol. Chem.* 255: 3798-3805.
41. Israel, M.A., M.A. Martin, T. Muja-mura, K.K. Takemoto, D. Rifkin, and R. Pollack. 1980b. Phenotype of polyoma-induced hamster cell lines. *J. Virol.* 35: 252-255.
42. Ito, Y., N. Spurr, and R. Dulbecco. 1977a. Characterization of polyoma virus T antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 74: 1259-1263.
43. Ito, Y., J.R. Brocklehurst, and R. Dulbecco. 1977b. Virus-specific proteins in the plasma membrane of cells lytically infected or transformed by polyoma virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74: 4666-4670.



44. Ito, Y., and N. Spurr. 1979. Polyoma virus T antigens expressed in transformed cells. *C.S.H.S. Quan. Biol.* 44: 149-157.
45. Ito, Y., N. Spurr, and B.E. Griffin. 1980. Middle T antigen as primary inducer of full expression of the phenotype of transformation by polyoma virus. *J. Virol.* 35: 219-232.
46. Kelly, Jr., T.J., A.M. Lewis Jr, A.S. Levine, and S. Siegel. 1974. Structure of two adenovirus-Simian virus 40 hybrids which contain the entire SV-40 genome. *J. Mol. Biol.* 89: 113-126.
47. Lania, L., M. Griffiths, B. Cooke, Y. Ito, and M. Fried. 1979. Untransformed rat cells containing free and integrated DNA of a polyoma non-transforming (hr-t) mutant. *Cell.* 18: 793-802.
48. Lania, L., A. Hayday and M. Fried. 1981. Loss of functional large T antigen and free viral genomes from cells transformed in vitro by polyoma virus after passage in vivo as tumor cells. *J. Virol.* 39: 422-431.
49. Magnusson, G., M.G. Nilsson. 1977. Multiple free viral DNA copies in polyoma virus-transformed mouse cells surviving productive infection. *J. Virol.* 22: 646-653.
50. Magnusson, G., and P. Berg. 1979. Construction and analysis of viable deletion mutants of polyoma virus. *J. Virol.* 32: 523-529.
51. Maniatis, T., E.F. Fritsch, and J. Sambrook. 1982. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory. New York. 545p.
52. McCance, D.J., A. Sebesteny, B.E. Griffin, F. Balkwill, R. Tiley and N.A. Gregson. 1983. A paralytic disease in Nude mice associated with polyoma virus infection. *J. Gen. Virol.* 64: 57-67.
53. Norgard, M.V., K. Keem, and J.J. Monahan. 1978. Factors affecting the transformation of Escherichia coli strain X-1776 by pBR322 plasmid DNA. *Gene* 3: 279-292.
54. Novak, U., S. Dilworth, and B. Griffin. 1980. Coding capacity of a 35% fragment of the polyoma virus genome is sufficient to initiate and maintain cellular transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77: 3278-3282.

55. Pantelouris, E.M. 1968. Absence of thymus in a mouse mutant. *Nature*. 217: 370-371.
56. Perricaudet, M., A. Fritsch, U. Pettersson, L. Philipson, and P. Tiollais. 1977. Excision and recombination of adenovirus DNA fragments in *Escherichia coli*. *Science* 196: 208-210
57. Prasad, I., D. Zouzas, and C. Basicilo. 1976. State of the viral DNA in rat cells transformed by polyoma virus. I. virus rescue and the presence of non integrated viral DNA molecules. *J. Virol.* 18: 436-444.
58. Roblin, R., E. Harle, and R. Dulbecco. 1971. Polyoma virus proteins I. Multiple virion components. *Virology* 45: 555-566.
59. Schaffhausen, B.S., J.E. Silver, and T.L. Benjamin. 1978. Tumor antigens in cells productively infected by wild-type polyoma virus and mutant NG-18. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75: 79-83.
60. Schaffhausen, B.S., and T.L. Benjamin. 1979. Phosphorylation of polyoma T antigens. *Cell* 18: 935-946.
61. Soeda, E., J.R. Arrand, N. Smolar, J.E. Walsh, and B.E. Griffin. 1980. Coding potential and regulatory signals of the polyoma virus genome. *Nature* 283: 445-453.
62. Southern, E. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-515.
63. Summers, D.K. and D.J. Sherratt. 1984. Multimerization of high copy number plasmids causes instability: Col E1 encodes a determinant essential for plasmid monomerization and stability. *Cell* 36: 1097-1103.
64. Tooze, J. 1981. DNA tumor viruses. Molecular biology of tumor viruses. Part 2. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory. New York.
65. Turler, H., and C. Salomon. 1977. Characterization of polyoma T antigens. *EMBO - INSERM. Colloq.* 69: 131-144.

66. Willetts, N.S., and A.J. Clark. 1969. Characteristics of some multiply recombination-deficient strains of Escherichia coli. J. Bacteriol. 100: 231-239.
67. Willetts, N.S., and D.W. Mount. 1969. Genetic analysis of recombination - deficient mutants of Escherichia coli K-12 carrying rec mutations cotransducible with thy A. J. Bacteriol. 100: 923-934.
68. Willets, N.S. A.J. Clark, and B. Low. 1969. Genetic location of certain mutations conferring recombination deficiency in Escherichia coli. Bacteriol. 97: 244-249.
69. Zouzias, D., I. Prasad, and C. Basilico. 1977. State of the viral DNA in rat cells transformed by polyoma virus. II. Identification of the cells containing non integrated viral DNA and the effect of viral mutations. J. Virol. 24: 142-150.